ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 19 No. 2 JUIN 1960

ACTION DES TOXINES MICROBIENNES SUR LES CULTURES DE TISSUS

I. *ACTION DE L'ALPHA-TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE SUR LES CULTURES DE TISSU EMBRYONNAIRE HUMAIN. ESSAIS DE TITRAGE.*

par

I. Mesrobeanu, M. Georgesco, T. Ieremia, Natalia Mitrică, Domnica Drăghici et Maria Mateesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie Microbienne et de la Chaire de Microbiologie de l'Institut Médico-Pharmaceutique, Bucarest).

— Manuscrit reçu le 11 février 1960 —

La méthode de culture de tissus en couche monocellulaire a été employée par différents auteurs pour l'étude de l'effet cytotoxique des diverses toxines microbiennes.

Nous rappelons, qu'en 1913, Levaditi et Muttermilch (11) ont signalé, pour la première fois, l'effet nocif de la toxine diphtérique sur les cultures en « goutte pendante » de fibroblastes d'embryon de poulet.

Depuis lors, une série d'auteurs, utilisant la même technique, ont étudié les effets nocifs des toxines des bacilles anaérobies, des bacilles diphtériques, des staphylocoques et des endotoxines des germes Gram-négatifs (3, 8, 10, 11, 14, 15, 16) sur divers tissus, en déterminant leurs modifications morphologiques ou métaboliques.

Récemment, Penso et Vicari (17) ont démontré qu'une série d'exotoxines microbiennes — à l'exception de celle du bacille tétanique — sont capables d'induire, sur diverses lignes des cellules normales et tumorales, en couche monocellulaire, des lésions très nettes, se caractérisant selon les produits utilisés, par une série de manifestations de dégénérescence et aboutissant finalement à la mort cellulaire.

L'intensité de ces réactions, qui s'installent progressivement, est en fonction de la nature et de l'âge des cellules, de la nature et de la dose de l'agent toxique, ainsi que de la durée de contact.

Les mêmes auteurs, ainsi que Sousa et coll. (7, 17, 18) ont essayé, pour la toxine diphtérique, la neutralisation de l'effet cytotoxique par l'antitoxine homologue, posant ainsi les bases d'une nouvelle méthode de titrage de ces produits. Cette méthode utilisée dans des conditions rigoureusement standardisées, présente l'avantage, par rapport aux titrages sur les animaux de laboratoire, d'éliminer le facteur de variation individuelle.

Dans le présent travail, nous étudions l'effet cytotoxique de l'alpha-toxine staphylococcique purifiée partiellement, ainsi que la nature des lésions qu'elle provoque sur les cultures de tissu d'embryon humain.

De même, nous relatons nos résultats concernant la neutralisation de l'effet cytotoxique de ce produit microbien par les anti-sérums respectifs.

TECHNIQUE.

Les embryons humains (âgés de 1½ à 3 mois), ont été récoltés dans diverses maternités, en solution de Hanks ou de Dulbecco, avec des antibiotiques (pénicilline + streptomycine).

En cas de nécessité, le matériel ainsi récolté peut être conservé 24 heures à + 4°, sans inconvénient. Les embryons débarrassés des viscères, sont coupés en petits morceaux et lavés plusieurs fois avec la solution de Hanks ou de Dulbecco. Après la pré-trypsinisation, le tissu est trypsinisé par la méthode discontinue, utilisant la trypsine Difco 0,25% en solution Hanks. Le tissu, soumis à l'action enzymatique, est agité à l'aide d'un agitateur électromagnétique, au bain marie, à 35° (méthode DULBECCO et VOGT) (5)).

Les divers lots de cellules trypsinisées, décantés, sont filtrés à travers gaze et conservés dans de la glace. La suspension des cellules est centrifugée 10 minutes à 800 t/m, par lots de 2—3 suspensions trypsinisées. Les dépôts cellulaires sont suspendus directement dans le milieu de culture, sans lavages. Finalement, les divers lots sont réunis, en ajustant la concentration de la suspension à 150.000 cellules/ml. On introduit dans des tubes de culture (de 16/16) 1,5 ml de cette suspension. Les tubes inclinés sont mis à 36,5°C.

Le milieu de culture est composé comme suit:

Sol. Hanks	40 ml
Sol. Earle	40 ml
Sol. hydr. de lactalbumine 5%	10 ml
Sérum de veau	10 ml
Sol. l-glutamine 200 millimoles	1 ml
Pénicilline	100 U/ml
Streptomycine	50 gamma/ml

On constate, après 24 heures, que les cellules se sont fixées sur la paroi déclive du tube de culture. En 4 jours, la culture, en couche monocellulaire, devient confluente avec prédominance des cellules de type fibroblastique.

À ce moment, le milieu de culture est substitué par 2 ml de milieu d'entretien, de la composition suivante:

Sol. Hanks	44 ml
Sol. Earle	44 ml
Hydr. de lactalbumine en sol. Hanks 5%	10 ml
Sérum de veau, inactivé	2, 5 ml
Sol. l-glutamine 200 millimoles	1 ml
Pénicilline	100 U/ml
Streptomycine	50 gamma/ml

pH final = 7,8

Les tubes sont maintenus à 36,5°C. Les observations périodiques démontrent que les cellules gardent leur aspect normal pendant 8 à 10 jours, sans qu'il soit nécessaire de renouveller le milieu d'entretien (fig. 1, 4, 7). Si on désire conserver longtemps les cellules, on renouvelle le milieu tous les 5—6 jours, même en absence du virage de l'indicateur. On peut ainsi conserver les cultures, aptes pour l'expérimentation, jusqu'à 3 semaines.

Dans nos expériences, nous avons utilisé seulement des cultures de 4 — 5 jours.

L'inoculation des produits est pratiquée après triage rigoureux des tubes de culture. On choisit les tubes qui présentent une culture confluente et sans aspect de dégénérescence. Après élimination du milieu de culture, on introduit 2 ml de milieu d'entretien, auquel on ajoute les produits d'expérience, qui ne doivent dépasser, en volume, 10% du milieu total. Pour chaque dilution, on utilise 5 tubes de culture. Les témoins contiennent 2 ml du milieu d'entretien.

Les tubes sont mis à 36,5° et examinés après 5, 10, 24 heures et ensuite journellement, pendant toute la durée de l'expérience.

Pour l'adaptation du *test de couleur (pH)* au titrage de l'effet cytotoxique de la toxine staphylococcique et pour la neutralisation de son effet par le sérum immun — on applique le principe de la technique de SALK et coll. (19) pour le titrage des anticorps poliomyélitiques.

Les cultures cellulaires sont effectuées en boîtes Roux, dans lesquelles on introduit 100 ml suspension contenant 150.000 cellules par ml. Après 4 jours d'incubation, la culture est soumise à l'action de la trypsine à 37°, pendant 5 à 10 minutes; les cellules détachées sont centrifugées 10 minutes à 800 t/m.

Le dépôt cellulaire est suspendu dans le milieu d'entretien, en concentration finale d'environ 250.000 cellules/ml. On introduit dans une série de tubes (10/100 mm) 1 ml de suspension, à laquelle on ajoute 0,5 ml du milieu d'entretien — contenant soit la toxine, soit l'antitoxine, soit toutes les deux. Pour chaque dilution des produits expérimentés, on a utilisé 5 tubes. Finalement, on ajoute 0,5 ml de paraffine liquide, neutre. Les cultures incubées en position verticale, à 36,5° sont examinées journellement, les résultats étant consignés seulement le 4-e jour. Si la couleur de l'indicateur (rouge de phénol) reste la même après ce délai, c'est un indice de dégénérescence cellulaire — conséquence de l'effet cytotoxique du produit expérimenté. Par contre, un virage vers le jaune, indique que les cellules ont gardé leur vitalité — preuve que l'effet cytotoxique ne s'est pas manifesté. On prend comme limite de l'effet cytotoxique, les tubes avec les dilutions du produit analysé, où le virage de l'indicateur atteint une nuance saumon.

RÉSULTATS

A. *Évolution de l'effet cytotoxique, provoqué par l'alpha-toxine staphylococcique dans les cultures de cellules d'embryon humain.* Après un intervalle variable de contact avec la toxine, la culture commence à donner des signes visibles de dégénérescence, plus ou moins intenses, selon la quantité de toxine et la période de contact.

Ainsi, pour les quantités correspondant à 2 d.c.m. (d.c.m. = dose cytotoxique minimum), dans notre cas équivalentes à 5 Lf par tube de culture, la couche monocellulaire se maintient intégralement, les cellules commençant toutefois à présenter des signes d'altération évidente. À l'examen direct, les cellules périphériques ont une tendance à devenir sphériques. Par coloration à l'hématoxiline, on constate l'apparition de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme. Par coloration au Soudan III, on ne constate pas de stéatose. Le cytoplasme, d'une proportion réduite de cellules, contient des granulations et manifeste une hypochromasie, leur contour est vaguement délimité.

À ce stade, les noyaux de la majorité des cellules présentent un aspect quasi-normal, et on observe même de nombreuses mitoses.

Parmi les fibroblastes on constate quand même des lésions à caractère régressif: atrophie cellulaire, marquée par une réduction de la surface cytoplasmatique, qui se rétracte, amincissant considérablement les cellules. Les noyaux présentent de la pycnose et de l'hyperchromasie.

Dans une phase de dégénérescence plus avancée (après 3 jours de contact), ou en ajoutant de plus grandes quantités de toxine, la culture est raréfiée, présentant des cellules très amincies, avec un noyau en pycnose, alors que d'autres cellules, toujours atrophiées, ont la tendance de s'agglomérer en masses (fig. Nos. 2, 5, 8).

La coloration post-vitale, au rouge neutre, démontre dans les cellules l'existence de noyaux non-colorés, indice qu'elles sont encore vivantes. La nuance rouge du vacuome (pH acide) paraît indiquer que les cellules sont en état sous-léthal. À ce stade, les témoins présentent un vacuome coloré en rose, donc avec une acidité plus faible. De même, le fait que dans la plupart des cellules ayant subi l'action de la toxine le colorant rouge neutre n'est plus strictement localisé dans le vacuome et qu'il diffuse dans le cytoplasme, constitue un indice en plus de l'état de sous-léthalité.

Après 3 jours de contact, on n'observe plus de mitoses.

Pour les grandes quantités de toxine par ex.: 6 d.c.m. = 15 Lf, on constate après 24 heures déjà, la raréfaction de la culture, et on peut déceler à l'œil nu dans le milieu des amas de cellules mortes.

Chez le peu de cellules qui restent attachées à la paroi du tube, les phénomènes de dégénérescence décrits sont très intenses.

Il est à remarquer que dans les tubes avec 1 d.c.m. d'alpha-toxine staphylococcique (2,5 Lf), l'effet cytotoxique s'installe lentement. Ainsi, après 3 à 4 jours de contact, les cellules commencent à présenter des phénomènes de nécrose. Chez un certain nombre d'entre elles, on observe même l'apparition de la stéatose — phénomène qui n'est pas décelé dans les cultures avec de grandes quantités de toxine, où la dégénérescence évolue rapidement.

Pendant tout le cours de notre expérimentation, les témoins ont gardé un aspect normal.

B. *Titrage de l'effet cytotoxique de l'alpha-toxine staphylococcique en cultures de tissu d'embryon humain.* On a incorporé à des lots de 5 tubes de cultures cellulaires, 2 ml de milieu d'entretien contenant des quantités croissantes de toxine: 0,025 ml; 0,05 ml; 0,10 ml; 0,15 ml; 0,20 ml.

Tableau I

Titrage de l'effet cytotoxique de l'alpha-toxine staphylococcique (lot No. 2) sur cultures monocellulaires d'embryon humain.

alpha-toxine staphylococcique en ml par tube de culture	proportion des tubes présentant l'effet cytotoxique après 4 jours	Lf par tube de culture
0,20	5/5	10
0,10	5/5	5
0,05	5/5	2,5
0,025	0/5	1,25

Les quantités de toxine utilisées peuvent varier en fonction du lot de toxine expérimenté, de sorte qu'une première orientation, par d'autres méthodes de

itrage, est nécessaire. Dans notre cas, on a utilisé la méthode de floculation ar les anti-sérums (Ramon).

La dose cytotoxique minimum (d.c.m.) a été considérée la plus petite uantité de toxine qui, incorporée à 2 ml de milieu, est capable d'induire, en

Fig. 1 — Culture normale, cellules d'embryon humain. Âge: 10 jours. Photo d'après le tube de culture Obj. X 8 Oc. X 10

g. 2 — Culture inoculée avec 4 d.c.m. — Lf α - toxine staphylococcique. Photo près le tube de culture, 24 h. de contact avec la toxine. Obj. X 8 Oc. X 10

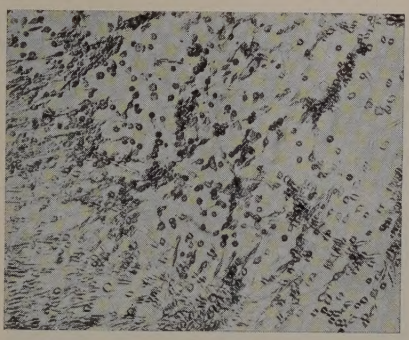


Fig. 3 — Culture inoculée avec 4 d.c.m. — 10 Lf α - toxine staphylococcique. Photo d'après le tube de culture, 3 jours de contact avec la toxine. Obj. X 8 Oc. X 10

jours de contact, un effet cytotoxique net, à plus de 50% des tubes de lture.

La d.c.m. est assez facile à établir, et, ainsi qu'il ressort du tableau I, elle t située entre 2,5 et 1,25 Lf par tube de culture.

Nos expériences ont été effectuées sur 3 lots de toxine staphylococcique, rifiée dans les mêmes conditions, par la méthode «acide-alcool», préconisée r MESROBEANU et MITRICĂ (12), pour la purification partielle de l'anatoxine,

procédé utilisé actuellement dans la production de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino ». Pour tous les 3 lots, nous avons trouvé 1 d.c.m. = environ 2,5 Lf.

Le tableau I montre les résultats obtenus avec la toxine Nr. 2, diluée jusqu'à 50 Lf/ml. Dans cette préparation, un Lf contient 0,00127 mg N. Etant donné

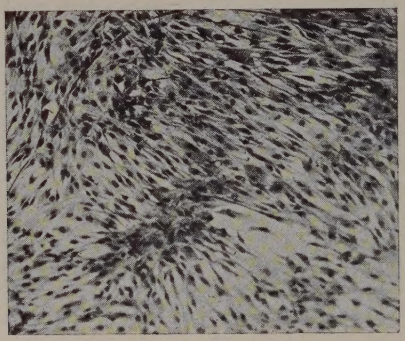


Fig. 4 — Culture normale. Âge: 10 jours. Coloration à l'hématoxiline. Obj. X 8 Oc. X 10

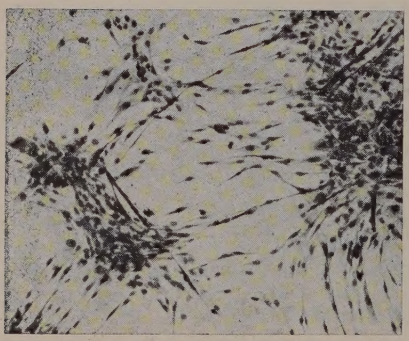


Fig. 5 — Culture inoculée avec 4 d.c.m.: 10 Lf toxine α staphylococcique après 24 h. de contact avec la toxine. Coloration à l'hématoxiline Obj. X 8 Oc. X 10

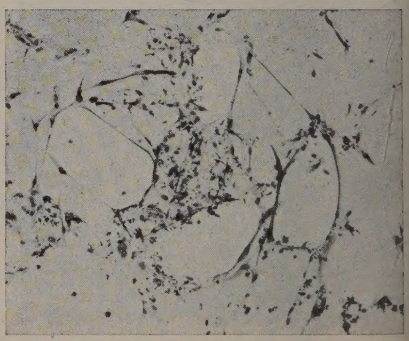


Fig. 6 — Culture inoculée avec 4 d.c.m.: 10 Lf α toxine staphylococcique, après 3 jours de contact avec la toxine. Coloration hématoxiline Obj. X 8 Oc. X 10

que 1 d.c.m. correspond à 0,05 ml, la toxine utilisée renferme 20 d.c.m./ml. De même, on peut établir qu'un d.c.m. contient environ 0,0032 mg N (0,00127 mg N × 2,5 Lf).

C. *Essais de titrage de la capacité antitoxique d'un sérum immun.* Pour le titrage de la capacité anti-cytotoxique d'un sérum sur les cultures de tissus embryonnaires humains, on a mis en contact des quantités fixes de toxine avec des quantités variables d'antitoxine. Après contact de minimum une demie

neure à la température du laboratoire, les mélanges ont été mis dans des cul-ures de 4—5 jours. On a noté la plus petite dilution du sérum, capable de neutraliser l'effet cytotoxique de la quantité de toxine utilisée.

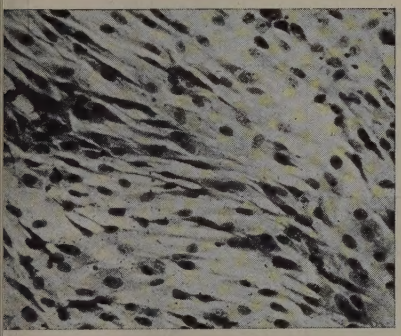


Fig. 7 — Culture normale, cellules d'embryon humain. Âge: 10 jours. Coloration à l'hématoxiline Obj. X 20 Oc. X 10

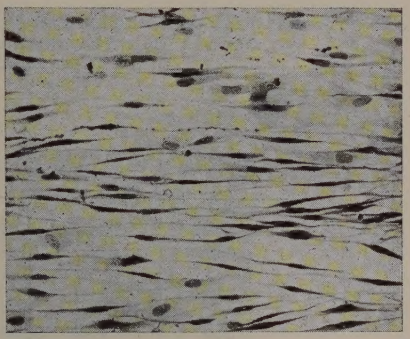


Fig. 8 — Culture inoculée avec 4 d.c.m. α toxine = 10 Lf, après 3 jours de contact. Coloration à l'hématoxiline Obj. X 20 Oc. X 10

On a utilisé les toxines appartenant aux lots 1 et 2, leur d.c.m. correspondant environ à 2,5 Lf par tube de culture.

Pour chaque tube de culture, on a utilisé 4 d.c.m., soit 10 Lf, dose qui produit un effet cytotoxique massif et rapide. On ajoute des quantités variables de sérum anti (voir tableau II). Après une demi-heure de contact, les mélanges toxine-antitoxine, sont ramenés à 2 ml pour chaque tube de culture, avec le milieu d'entretien. Cette quantité est transférée sur les cultures de tissus. On utilise parallèlement les témoins suivants: 5 tubes avec milieu d'entretien seulement, 5 tubes témoins avec la plus grande quantité de sérum anti employée, 5 tubes avec 4 d.c.m. toxine.

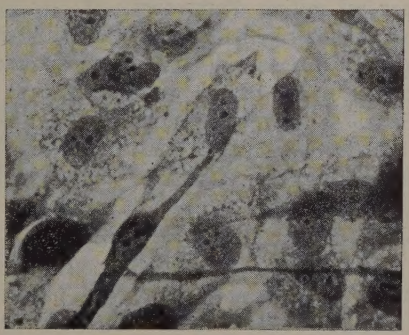


Fig. 9 — Cellules d'embryon humain après 24 h. de contact avec α - toxine staphylococcique = 5 Lf par tube. Coloration à l'hématoxiline Obj X 40 Oc. X 10

La dose limite de sérum, capable d'induire la neutralisation de l'effet cytotoxique (d.l.n.), a été considérée la plus petite quantité de sérum qui prévient l'apparition de la dégénérescence cellulaire, dans la presque totalité des tubes.

Ainsi qu'il ressort du tableau II, dans nos conditions expérimentales, la d.l.n. s'établit facilement.

L'anti-sérum (lot A) utilisé dans cette expérience, est un sérum de cheval, non-purifié, préparé avec l'anatoxine et la toxine staphylococcique brute (filtrats

de cultures). Le sérum a été titré comparativement à un sérum standard (Copenhague) et il contient 350 unités floculantes/ml.

Tableau II

Titrage de la capacité anti-cytotoxique d'un sérum immun sur les cultures de tissus embryonnaires humains.

Mélange:			
Sérum anti (lot A)		Toxine Nr. 2 (50 Lf/ml)	Proportion des tubes présentant l'effet cytotoxique
ml/tube culture	Unités antitoxiques (Lf)		
0,035	12,25	0,20 ml =	0/5
0,030	10,50	4 d.c.m. = 10 Lf	0/5
0,025	8,75		0/5
0,020	7,00		0/5 neutralisation
0,015	5,25		4/5
0,010	3,50		5/5

Une unité neutralisante de sérum (1 d.l.n.) sera équivalente à 1/4 de la quantité utilisée pour le premier lot de tubes, où a eu lieu la neutralisation, étant donné que cette quantité a anihilé l'effet cytotoxique de 4 d.c.m. Par conséquent, d'après le tableau II, cette quantité étant de 0,020: 4 = 0,005 ml, 1 ml de notre sérum contient 200 d.l.n.

D. *Le test du pH.* Pour effectuer ce test, on a utilisé des suspensions cellulaires trypsinisées (âgées de 4—5 jours), contenant environ 250.000 éléments par ml milieu d'entretien.

On a réparti en tubes (10/100 mm) 1 ml de suspensions cellulaires, auxquelles on a ajouté 0,5 ml de diverses dilutions de toxine dans le milieu d'entretien et 0,5 ml de paraffine neutre. Pour chaque dilution de toxine, on utilise 5 tubes; incubation à 36,5°, pendant quatre jours.

La dose cytotoxique minimum est, dans ce cas, la plus petite quantité de toxine capable d'inhiber le métabolisme cellulaire. Elle est marquée par la coloration saumon du milieu, tandis que la teinte jaune indique un métabolisme actif.

On a constaté que la dose cytotoxique minimum est similaire, soit qu'on emploie le test du pH, soit qu'on utilise la méthode de l'effet cytotoxique sur les cultures monocellulaires.

Pour les expériences de neutralisation, on répartit dans chaque tube, 1 ml suspension cellulaire, 0,5 ml de milieu d'entretien, contenant 4 d.c.m. (10 Lf) et diverses quantités de sérum anti, ainsi que 0,5 ml paraffine (tableau III). Les quantités fixes de toxine (4 d.c.m.) et les quantités variables de sérum anti, ont été préalablement en contact, pendant 1 heure.

La neutralisation de l'effet cytotoxique a été consignée, après 4 jours à 36.5°; la limite est représentée par la plus petite quantité de sérum permettant un virage de l'indicateur vers la nuance rose-saumon.

Dans le tableau III, sont consignés les résultats obtenus.

Tableau III

Titrage de la capacité anti-cytotoxique d'un sérum par le test du pH.

Mélange:			Virage du pH (4 jours)
Sérum anti		Toxine	
ml/tube	contenant les unités antitoxiques suivantes		
0,035	12,25	0,20 ml =	5/5 jaune
0,030	10,50	4 d.c.m. = 10 Lf	5/5 jaune
0,025	8,75		5/5 jaune
0,020	7,00		5/5 rose/saumon
0,015	5,25		5/5 rouge
0,010	3,50		5/5 rouge

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Nous avons choisi pour le titrage de l'effet cytotoxique de l'alpha-toxine staphylococcique, ainsi que pour les recherches de neutralisation par les sérums anti, les cultures en couche monocellulaire d'embryon humain.

En ce qui concerne le test de couleur (pH), bien qu'il implique une technique assez facile à réaliser, donnant des résultats superposables à ceux du titrage en tubes de cultures monocellulaires, il ne peut démontrer l'évolution, ni la nature des lésions cellulaires provoquées par les agents cytotoxiques.

La dose cytotoxique minimum (d.c.m). de l'alpha-toxine staphylococcique a été considérée la plus petite quantité de toxine capable d'induire un effet cytotoxique net, à plus de 50% des cellules de chaque tube de culture.

À la suite de nos recherches, nous avons constaté qu'il existe un rapport assez constant entre l'unité d.c.m. et le Lf de nos préparations, soit 1 d.c.m. = = 2,5 Lf.

Dans les essais de neutralisation de l'effet cytotoxique par le sérum immun, on a tenu compte de cette correspondance. Ainsi, la dose limite de sérum qui neutralise (d.l.n.) une dose cytotoxique minimum (d.c.m.) correspond à la plus petite quantité de sérum qui préviendra l'apparition du moindre phénomène de dégénérescence cellulaire.

Si on compare la méthode de titrage par floculation, avec la méthode du titrage en cultures de tissus, on constate que, dans nos conditions expérimentales, il faut utiliser pour la neutralisation de 4 d.c.m., respectivement 10 Lf, environ 8 unités floculantes de sérum en cultures de tissus et environ 7—8 unités pour le test du pH.

Vu que l'effet cytotoxique s'installe à la suite d'un contact avec 2,5 Lf toxine par tube de culture, il est normal que si on laisse en liberté dans le mélange toxine-antitoxine, environ 2 Lf toxine, cette quantité ne peut induire des modifications dans l'aspect de la culture. Donc, pour neutraliser 10 Lf de notre toxine, il suffit d'environ 8 unités floculantes de sérum.

Le fait que les cellules peuvent supporter environ 2 Lf de toxine, s'explique par la résistance naturelle du tissu respectif, ainsi que par l'existence dans cette toxine d'une quantité quelconque d'anatoxine apparue à la suite du processus de purification.

CONCLUSIONS

On a démontré que l'alpha-toxine staphylococcique produit un effet cytotoxique net sur les cultures en couche monocellulaires d'embryon humain.

L'effet cytotoxique se manifeste dans une première phase, par l'hypertrophie des cellules et la vacuolisation du cytoplasme.

Dans les phases plus avancées de dégénérescence s'installent des phénomènes nets de type régressif, la rétraction du cytoplasme et l'apparition dans les préparations des noyaux en pycnose et hyperchromiques.

Finalement, on observe la nécrose cellulaire, l'agglomération en masses et le détachement des cellules de la paroi du tube de culture.

L'effet cytotoxique disparaît, lorsque la toxine est préalablement neutralisée par l'antitoxine spécifique.

La toxine staphylococcique et l'antitoxine spécifique peuvent être titrées, soit sur cultures monocellulaires d'embryon humain, soit par le test de couleur (pH), utilisant le même type de cellules.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alessandro D. G. — Riv. Inst. Sier. Ital., 1957, **32**, 157.
2. Janconesco M. et Aderca J. — Studii şi Cercet. Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., 1958. **9**, 428.
3. Barg R. S. — Ann. Inst. Pasteur, 1937. **59**, 536.
4. Ciumakov M. P. — Akad. Med. Nauk, URSS, 1957, 21—25 Mai
5. Dulbecco R. et Vogt M. — J. exp. Med., 1954. **99**, 167, 183.
6. Enders J. — Poliomyelitis WHO., Geneva, 1955. p. 269.
7. Ghersanovici V. N., Agol V. I. et Elingof R. N. — Akad. Med. Nauk, URSS, 1958. 19—21 juin.
8. Gulloti A. — Riv. Inst. Sier. Ital., 1957. **32**, 172.
9. Horodniceanu F., Klein R., Wisner B., Sergiesco Dina et Zamfiresco M. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie., 1958, **17**, 289.
10. Lasfargues E. et Delaunay A. — Ann. Inst. Pasteur, 1946, **72**, 38.
11. Levaditi C. et Muttermilch St. — C. R. Soc. Biol., 1913, **74**, 379, 614, 1305, 1379.
12. Lawrence J. C. et Brit. J. exp. Path 195). **40**, 8
13. Mesrobeanu L., Alexenco E. et Mitrică N. — Arch. Roum. de Pathol exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 211.
14. Medvekoka A. A., Jilova G. P., Kliuciareva T. E., Gorev N. E. et Colesnikova L. V. — Akad. Med. Nauk, URSS, 1958, 19—21 juin.
15. Okab L. et Kitasato. — Kit. Arch., 1933, **10**, 41.
16. Okane L. et Teruchi Y. — Acta Path. Microbiol., Scand. Suppl. 3, 1930. 431.
17. Penso G. et Vicari G. — Third Int. Congr. Biol. Stand. Opatija, 1957, 2—6 sept. Rendic. Inst. Supp. Sanita, 1957, **20**, 655, 659, 1109; 1959, **22**, 131, 135, 138.
18. Sousa C. P. et Evans D. G. — Brit. J. exp. Pathol., 1957. **38**, 644.
19. Salk J. E., Joungner J. S. et Ward E. N. — Am. J. Hyg., 1954. 60, 214.

ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙНЫХ БОКСИНОВ НА КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ

1. ДЕЙСТВИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО АЛЬФА-ТОКСИНА НА КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭМБРИОНА. ПОПЫТКИ ТИТРОВАНИЯ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В работе доказано что стафилококковый альфа-токсин ироявляет явное циаотоксическое дейсчтвие на однослойные культуры тканей человеческого эмбриона.

Цитотокоическое действие проявляется в первой очереди в гипертрофии клеток и вакуолизации протоплазмы.

В более поздних стадиях перерождения устнанавливаются явления регрессивного типа в виде: сжатия протоплазмы и появления в препаратах пикнотических и гиперхромных ядер.

К концу процесса отмечается некроз клеток, скопление в виде плакатов и отделение клеток от стенок пробирки.

Цитотоксическое действие исчезает после предварительной нейтрализации токсина специфическим антитоксином.

Стафилококковый токсин и специфический анти-токсин могут быть титрованы либо на одноклеточных культурах человеческого эмбриона, либо при помощи теста изменения цвета (pH) при применении тех же клеток.

DIE WIRKUNG MIKROBIELLER TOXINE AUF GEWEBEKULTUREN

I. *DIE WIRKUNG VON ALPHA-STAPHYLOKOKKENTOXIN AUF KULTUREN MENSCHLICHER EMBRYONÄRGEWEBE. VERSUCHE QUANTITATIVER AUSWERTUNG*

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde nachgewiesen, dass das Alpha Staphylokokkentoxin, auf Einzell schicht kulturen von menschlichen Embryonärgewebe, eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung ausübt.

Während einer ersten Phase äussert sich die zytotoxische Wirkung in einer Hypertrophie der Zellen sowie durch Vakuolenbildung im Zellplasma.

In fortgeschritteneren Phasen der Entartung treten Erscheinungen ausgesprochener Zellregression auf, wie Schrumpfung des Zellplasmas und Vorkommen von pyknotischen und hyperchromen Zellkernen in den Präparaten.

Schliesslich beobachtet man Zellnekrose, rasenartige Anhäufung der Zellen und ihre Ablösung von den Wänden des Brutröhrchens.

Die zytotoxische Wirkung tritt nicht ein, wenn das Toxin vorher durch spezifisches Antitoxin neutralisiert wurde.

Staphylokokkentoxin und spezifisches Antitoxin können sowohl in Einzellschichtkulturen menschlichen Embryonärgewebes, als auch durch den Farbtest (pH) in Kulturen derselben Zellen, quantitativ ausgewertet werden.

THE ACTION OF MICROBIAL TOXINS ON TISSUE CULTURES.

I. *THE ACTION OF STAPHYLOCOCCAL ALPHA-TOXIN ON HUMAN EMBRYO TISSUE CULTURES. ATTEMPTS AT QUANTITATIVE ASSAY.*

SUMMARY

Staphylococcal alpha-toxin exerts a clear cut cytotoxic action on human embryonic cells.

In a first stage, the cytotoxic effect is expressed by hypertrophy of the cells and vacuolization of the cytoplasm.

In more advanced stages of degeneration, obvious processes of the regressive type are recorded, such as shrinking of the cytoplasm and the appearance of pycnotic nuclei in the preparation.

Finally, the cells are seen to undergo necrosis, to agglomerate in patches, and to become detached from the wall of the culture tube.

The cytotoxic effect is prevented by previous neutralization of the toxin with specific antitoxin.

Staphylococcal toxin and the specific antitoxin may be quantitatively determined in monolayer cultures of human embryonic tissue as well as by means of the colour test (pH) performed with the same type of cells.

CAPACITÉ « INDUCTRICE » DE L'ISOTOPE RADIOACTIF COBALT 60 (GAMMA IRRADIATION), AVEC PRODUCTION DE PHAGE LYTIQUE ACTIF, DES « ÉCO-SYSTÈMES PHAGES-SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* » SOUMIS À L'ACTION DE CET AGENT

par

M. Ciucă, T. Meitert, Eugenia Meitert et St. Meitert

(Travail du Laboratoire de la Chaire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Bucarest, du Centre National de Bactériophages Références et de l'Institut de Physique atomique de l'Académie Roumaine)

— Manuscrit reçu le 19 mai 1959 —

En 1950 Lwoff, Siminovitch et Kjelgaard (1) signalaient pour la première fois chez *B. megatherium* les propriétés inductrices des rayons ultra-violets sur les souches lysogènes. Ultérieurement, cette qualité a été étudiée aussi pour d'autres germes: *Ps. aeruginosa* par Jacob (2), *Staphylococcus aureus* par Welsch, 1953 (3), *E. Coli* par Weigle et Delbruck, 1951 (4), *C. diphtheriae* par Barksdale, 1953 (5), chez différentes *Salmonella* par Williams-Smith, 1953 (6), *B. cereus* par Kellenberger, 1952 (7), etc.

Au cours de ces recherches, on a constaté que les rayons ultra-violets d'une longueur d'ondes de 2537 Å —en fonction d'une dose optime utilisée—peuvent déclancher, après une période de latence de 80 à 85 minutes, la « production de phage libre » dans presque toute la population « lysogène » irradiée.

En 1951 Latarjet (8) montre que chez *B. megatherium* le même effet peut s'obtenir à l'aide des rayons X, alors que Tobin (9) en 1953, irradiant une culture de B. pyocyanique par les rayons X, à la fin de la période de multiplication exponentielle, trouve que la période de latence est plus courte (55—60 minutes) que par rayonnement ultra-violet. Il montre également, qu'en employant les rayons X, on obtient une courbe « d'induction exponentielle », alors que pour les rayons ultra-violets, la courbe présente un aspect plus complexe.

En 1955, Marcovich (10) expérimentant avec les rayons X et gamma sur le système lysogène *E. coli* K 12 (lambda) confirme les résultats obtenus par Tobin et montre des effets similaires dus à l'action inductrice, tant par les rayons X que par les rayons gamma. Il prouve également qu'en employant les rayons X, le phénomène de « photo-restauration », observé dans le cas des « rayons ultra-violets » n'a plus lieu.

Dans ce travail, on se propose d'étudier l'effet inducteur des rayons gamma (cobalt radio-actif) sur 20 souches de *Ps. aeruginosa* et le spectre d'activité des phages endogènes issus des souches irradiées, par rapport aux caractères de lysogénie des mêmes souches non-irradiées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches : 20 souches de *Ps. aeruginosa* isolées de différents produits pathologiques (infections urinaires, abcès, infections ostéo-articulaires, etc.).

Comme source d'irradiation, on a employé une source de cobalt radioactif (Cobalt 60) de 26 Cu, de l'Institut de Physique atomique de l'Académie Roumaine.

Technique : des cultures de différents âges, en eau peptonée (1%) dans des tubes en verre 18 cm/18 mm ont été exposées à différentes doses de gamma-radiation. En fonction de la distance entre la source et l'objet à irradier et du temps d'irradiation, on a calculé (sur la base des tableaux) la dose de gamma-radiation mesurée en roentgens (r).

A un intervalle variant entre 75 et 150 minutes après l'irradiation, on a inactivé les cultures pendant une heure à 60° (au bain d'inactivation) après avoir effectué au préalable des passages pour contrôler s'il existe des germes vivants dans les cultures après irradiation.

L'élibération du phage « lysogène » dans les cultures irradiées et inactivées a été contrôlée par la technique des gouttes, en boîtes de Petri sur gélose 2%, ensemencées préalablement avec des cultures en eau peptonée de B. pyocyanique « lysosensibles » âgées de 1 à $1^1/_2$ h. La lecture du résultat a été faite après 18 à 20 heures d'incubation à 37°. En concomitance, on a contrôlé, prenant comme témoins, les mêmes cultures, dans les mêmes conditions de travail, mais qui n'avaient été soumises à aucune espèce d'irradiation.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES ET RÉSULTATS.

Dans une première série d'essais, on a soumis à l'irradiation 20 souches de *Ps. aeruginosa* (cultures en eau peptonée, âgées de 18 heures). La dose reçue a été de 500 r. Après une période de latence de 80 minutes, les cultures irradiées ont été inactivées (1 h à 60°C) et testées ensuite sur gélose en boîte de Petri (comparativement avec les mêmes cultures non-irradiées) envers les 20 souches de B. pyocyanique disponibles.

Dans le Tableau I nous donnons les résultats de la recherche des phages lysogènes correspondant aux cultures irradiées en comparaison avec les cultures non-irradiées.

Il ressort de ce tableau qu'à part les aires de lyse obtenues par les « phages lysogènes » des cultures non-irradiées, il apparaît à la suite de l'irradiation une série d'aires de lyse supplémentaires, correspondant aux souches irradiées Nos. 13, 16 et 36 — alors que pour d'autres souches: 4 et 42 — on constate la disparition de certaines aires de lyse, à la suite de l'irradiation.

Des 20 souches étudiées, 14 se sont montrées lysogènes, dont une (No. 36) seulement à la suite de l'irradiation.

Dans une autre série d'essais, on a choisi pour l'irradiation 4 souches qui présentaient certaines particularités et notamment:

souche No. 1 — non-lysogène, lysosensible
souche No. 13 — lysogène, lysosensible
souche No. 41 — lysogène (initialement non-lysogène), lysosensible
souche No. 42 — lysogène, lysorésistante.

Chacune de ces cultures a été soumise aux doses d'irradiation suivantes: 5 000 r, 10 000 r et 100 000 r. Les mêmes irradiations ont été faites avec des cultures de 4 et 18 heures. Dans tous ces cas, on a recherché parallèlement les résultats obtenus après une période de latence de 75 et 150 minutes (90 minutes dans le cas des doses de 100 000 r).

La souche No. 1 dans nos conditions d'expériences n'a pas élibéré de phages endogènes, indifféremment des doses d'irradiation utilisées, de l'âge des cultures ou de la période latente écoulée depuis l'irradiation jusqu'à l'inactivation.

Tableau 1

Présence de phages endogènes dans les souches de Pseudomonas aeruginosa irradiées par 500 r, par rapport aux mêmes souches non-irradiées

| Souches indicatrices | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 9 | | 13 | | 14 | | 15 | | Recherche de la pré- | | |

Tableau II

Examen des phages endogènes après irradiation des souches de Pseudomonas aeruginosa par 5.000 r, 10.000 r et 100.000 r, par rapport aux mêmes souches non-irradiées

Souches (inactivées) pour la recherche du phage	Dose reçue	5.000 r				10.000 r				100.000 r		Témoins	
	Âge de la culture	4^h	4^h	18^h	18^h	4^h	4^h	18^h	18^h	4^h	18^h	4^h	18^h
	Période de latence	75′	150′	75′	150′	75′	150′	75′	150′	90′	90′	—	—
	Souche indicatrice												
13	1	0	0	CL+ c.r.	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	0	CL+ c.r.	CL+ .cr.	CL c.r.+
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+n	1+n
	26	0	0	CL+ c.r.	CL+ c.ép.r.	0	0	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.	0	CL+ c.r.	CL+ c.ép.r.	CL+ c.r.
	51	0	0	CL+ c.ép.r,	C+ c.ép.r.	0	0	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.	0	0	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.
42	1	SCL	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	SCL	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.
	9	0	0	0	CL+ c.ép.r.	0	CL+ c.r.	0	CL+ c.r.	1+n	CL+ c.r.	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.
	10	2+n	0	0	0	0	CL+ c.ép.r.	CL+ c.r.	CL+ c.ép.r.	1+n	0	CL+ c.ép.r.	CL+ c.ép.r.
	11	SCL	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.
	40	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL	CL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL	CL+ c.r.	CL	CL+ c.r.	CL
	43	SCL	SCL	CL+ c.r.	CL+ col. r.	SCL	CL+ col r.	CL+ c.r.	CL+ col. r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ col. r.	CL+ col. r
	51	CL	CL+ c.r.	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
41	9	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	CL+ c.r.	CL+ c.r.
	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	CL+ c.ép.r.

Légende:
CL = lyse confluente
CL+ c.r. = lyse confluente avec culture résistante.
CL+ c.ép.r. = lyse confluente avec culture épaisse résistante
CL+ col. r. = lyse confluente avec colonies résistantes.
SCL = lyse semi-confluente
1+n = approx. 20 à 30 plages normales.
0 = lyse absente.

Dans le cas des souches lysogènes: 13, 42 et 41 (Tableau II) nous constatons qu'en rapport avec les cultures non-irradiées, les cultures irradiées subissent souvent une inhibition en ce qui concerne l'élibération du phage endogène. Cette action inhibitrice s'avère plus évidente dans le cas de l'irradiation des cultures jeunes, alors que les variations de la période latente, entre 75 et 150 minutes semblent ne pas jouer un rôle essentiel.

Comme dans ces expériences nous avons cherché en premier lieu des différences qualitatives (et moins les différences quantitatives), nous avons procédé au titrage (par la méthode de dilutions décimales) des différents échantillons de « phage endogène » provenant de la souche No. 42 envers la souche indicatrice No. 40 (Tableau III)

Tableau III

Titrage vis-à-vis de la souche indicatrice Nr. 40, des échantillons de phage endogène appartenant à la souche lysogène Nr. 42.

Dose reçue	5.000 r				10.000 r				100.000 r		Témoins	
Âge de la culture ..	4h	4h	18h	18h	4h	4h	18h	18h	4h	18h	4h	18h
Période de latence	75'	150'	75'	150'	75'	150'	75'	150'	90'	90'	—	—
Test effectué sur agar	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL	CL	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL+ c.r.	CL	CL+ c.r.	CL	CL+ c.r.	CL
Titre des phages respectifs.....	10^{-5}	10^{-4}	10^{-9}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	1^{-7}	10^{-9}

Légende CL = lyse confluente
CL + c.r. = lyse confluente avec culture résistante.

On constate de ce tableau une diminution du titre phagique après les irradiations avec 5.000 r, 10.000 r ou 100.000 r, surtout pour les cultures jeunes.

En ce qui concerne l'existence des germes vivants dans les cultures irradiées, les passages effectués à la fin de la période de latence ont démontré dans la totalité des cas, une croissance abondante et donc, l'existence d'un nombre important de germes vivants.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les recherches préliminaires présentées dans cette note ont eu comme premier but la mise en évidence de certaines différences qualitatives entre les cultures irradiées et les cultures non-irradiées de *Ps. aeruginosa*, dans différentes conditions d'exposition aux irradiations gamma de l'isotope radioactif Cobalt 60.

Nos résultats, pareils à ceux constatés par Marcovich (10) dans le cas d'irradiation par les rayons X, laissent entrevoir qu'il existe une dose optime de radiation qui, sans produire la mort des germes, a la capacité de mettre en évidence (bien entendu par maturation du phage endogène) les bactériophages latents. À part cela, il est possible comme nous l'avons constaté, que des valences supplémentaires, masquées avant l'irradiation, apparaissent.

Cette dose optime d'irradiation, définie par Jacob (11) comme la plus petite dose d'agent inducteur capable de provoquer le déclanchement du phage dans l'ensemble de la population lysogène considérée, semble différer d'une souche

à l'autre (Jacob, Marcovich). C'est ainsi que nous nous expliquons le rôle inducteur pour certaines souches de la dose de 500 r, que nous avons utilisée dans la première série d'expériences, alors que pour d'autres souches les valences qui existaient chez les souches témoins non-irradiées disparaissent.

La mise en évidence de certaines nouvelles valences, ou contrairement, la limitation du spectre de lysogénie d'un phage endogène sous l'influence du facteur inducteur, pourrait s'expliquer, soit par une modification de la polyvalence (ou monovalence) du prophage respectif, soit plutôt par l'existence de souches polylysogènes chez lesquelles l'un des prophages subit une maturation sous l'influence du facteur inducteur, à côté d'un ou plusieurs prophages qui subissent une maturation « spontanée ».

Avec la croissance de la dose de radiation gamma (5000 r et plus), apparaît un effet nettement inhibiteur sur l'élibération du phage endogène, en rapport avec les cultures témoins non-irradiées, surtout lorsqu'il s'agit d'irradiation de certaines cultures jeunes.

Dans la phase actuelle de recherches, nous trouvons nécessaire de poursuivre l'établissement des doses optimes inductrices et des zones de radiation qui permettent la mise en évidence chez différentes espèces bactériennes, des phages endogènes, qui ne peuvent l'être par d'autres méthodes classiques: acquisition de nouvelles connaissances relatives aux conditions de milieu, température, l'exposition à l'action du facteur inducteur, durée de la période de latence, existence de différents facteurs restaurateurs de l'effet inducteur, et les meilleurs moyens techniques pour l'inactivation des germes qui ont survécu dans la culture induite, etc.

Le phénomène observé chez les souches lysogènes, au cours des passages répétés sur milieu de culture dans les conditions de laboratoire, — ne permettant pas de déceler par la méthode classique le phage endogène ou certaines valences du spectre de lysogénie de ce phage, — a été également observé chez les souches de B. pyocyaniques, phénomène qui complique certainement l'interprétation des données.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lwoff A., Siminovitch L. et Kjelgaard N. — Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79**, 815.
2. Jacob F. — C.R. Acad. Sc., 1950, **231**, 1585.
3. Welsch M. — C. R. Soc. Biologie, 1952, **146**, 1271.
4. Weigle J. J. et Delbruck M. — J. Bact., 1951. **62**, 301.
5. Barksdale W. L. et Pappenheimer A. M. — J. Bact., 1954 **67**, 220.
6. Williams-Smith H. — J. gen. Microbiol., 1953. **8**, 116.
7. Kellenberger G. — Pathol. u. Bakteriol., 1952, **15**, 73.
8. Latarjet R. — Ann. Inst. Pasteur., 1951. **81**, 389.
9. Tobin J. — Brit. J. exp. Pathol., 1953. **34**, 635.
10. Marcovich H. — Ann. Inst. Pasteur, 1956, **90**, 303 et 458.
11. Jacob F. — Les bactéries lysogènes et la notion de provirus, 1954. Paris, Masson.

«ИНДУКЦИОННАЯ» СПОСОБНОСТЬ РАДИОАКТИВНОГО ИЗОТОПА КОБАЛЬТА 60 (ГАММАИЗЛУЧЕНИЕ). ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНОГО ЛИТИЧЕСКОГО ФАГА В БИОСИСТЕМАХ ФАГИ-ШТАММЫ СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ ЭТОГО ИНДУКЦИОННОГО АГЕНТА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В рамках общей программы изучения характеристик экологии фаго-бактерийных систем, приводятся результаты первых опытов по «индукции лизогении, путем облучения 2 штаммов синегнойной палочки, выделенных из разных патологических материалов

(мочевые инфекции, абсцессы, костносуставные инфекции и т.д.), при применении разных доз излучений гамма (500 r, 5000 r, 10.000 r, 100.000 r)

Применяли штаммы, выращенные в течении 3, 4 и 18 часов при 37°C. После облучения в течении 5′—60′-в зависимости от условий облучения: расстояние от радиоактивного источника до об"екта, полученная доза излучения и после « латентного периода » в 75′—150′, штаммы инактивировались прогреванием-в течении часа при 60° С. Испытания « лизогенности » облученных штаммов и контрольных (те-же штаммы (необлученные) проводились по отношению к индикаторным штаммам, в чашках Петри с 2%-ным агаром, по классическим методикам работы.

У 3 из 20 штаммов облученных с 500 r выявлены качественные отличия от контрольных, необлученных штаммов, выраженные наличием свободного фага, активного по отношению к применяемым индикаторным штаммам; у других двух облученных штаммов отмечены изменения спектра лизогенности.

Параллельно с увеличением дозы излучений гамма (5000 r, 15.000 r, 100.000 r) появляется резкое тормозящее действие на освобождение и возможное созревание эндогенного фага (по сравнению с контрольными необлу ченными штаммами), особенно при облучении молодых штаммов (3—4 часов роста).

Проведенные наблюдения дают возможность предполагать значение оптимальной дозы облучения, которая без того чтоб обусловить гибель всех микробов — обладает индукционными свойствами по отношению « профага » в исследуемых штаммах.

Предлагают дальнейшие исследования и расширение тематики по изучению « индукционного действия », примененного физического « мутагенного » фактора.

DIE „INDUZIERENDE" FÄHIGKEIT DES RADIOAKTIVEN ISOTOPEN KOBALT 60 (GAMMASTRAHLEN). BILDUNG AKTIVER LYTISCHER PHAGEN AUS OEKOSYSTEMEN VON PHAGEN-*PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-STÄMMEN, DIE DER WIRKUNG DIESES INDUZIERENDEN AGENS AUSGESETZT WURDEN

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des allgemeinen Forschungsprogrammes betreffs der charakteristischen Oekologie „phagobakterieller Systeme" werden die ersten Ergebnisse von Versuchen wiedergegeben, deren Ziel es war, die „Lysogenie" bei 20 von verschiedenen pathologischen Fällen (Infektionen der Harnwege, Abscesse, Knochen-und Gelenksinfektionen, u.s.w.) isolierten Stämmen von *Pseudomonas pyocyanea*, durch Bestrahlung mit verschiedenen Dosen von Gammastrahlen (500 r, 500 r, 10.000 r, 100.000 r) zu „induzieren".

Die verwendeten Stämme wurden 3, 4 und 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach der Bestrahlung, die 5—60 Minuten dauerte (in Abhängigkeit von den Bestrahlungsbedingungen: Abstand zwischen der Strahlenquelle und dem Gegenstand, verabreichte Strahlungsdosis, u.s.w.) und nach Ablauf einer „Latenzperiode" von 75 bis 150 Minuten, wurden die Stämme durch erwärmen auf 60°C, während einer Stunde inaktiviert. Die „Lysogenie" der bestrahlten Stämme und der entsprechenden Kontrollen (die gleichen Stämme, nicht bestrahlt) wurde gegenüber Indikatorstämmen, auf 2-prozentigem Agar in Petrischalen, nach den klassischen Methoden geprüft.

Bei 3 der mit 500 r bestrahlten 20 Stämme konnten qualitative Unterschiede, im Vergleich mit den nicht berstrahlten Kontrollstämmen festgestellt werden. Sie bestanden in der Anwesenheit eines freien Phagen, der den verwendeten Indikatorstämmen gegenüber wirksam war, während bei anderen 2 bestrahlten Stämmen, Änderungen des Lysogeniespektrums beobachtet wurden.

Mit zunehmender Gammastrahlendosis (5.000 r, 10.000 r, 100.000 r) tritt ein ausgesprochener Hemmungseffekt in Bezug auf die Freisetzung und eventuelle Reifung des endogenen Phagen auf (im Vergleich mit den gleichen, nicht bestrahlten Kontrollstämmen), insbesonders im Falle der Bestrahlung junger Stämme (3—4 Stunden).

Die gemachten Beobachtungen weisen auf die Bedeutung einer optimalen Bestrahlungsdosis hin, die, ohne das Absterben aller Keime zu verursachen, imstande ist eine Reifung des „Prophagen" in den untersuchten Stämmen zu induzieren.

Es werden Vorschläge zur Fortführung und Erweiterung der Forschungen hinsichtlich der „induzierenden Wirkung" des verwendeten „mutagenen" Faktors gemacht.

THE "INDUCING" CAPACITY OF THE RADIOACTIVE ISOTOPE COBALT 60 (Gamma Rays). PRODUCTION OF ACTIVE LYTIC PHAGE FROM "OECOSYSTEMS" OF PHAGE – *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS SUBJECTED TO THE ACTION OF THIS INDUCING AGENT.

SUMMARY

Within the framework of the general research programme concerning the characterstic œcology of "phagobacterial systems", the first results are reported of attempts to "induce" lysogenicity by irradiating 20 strains of *Pseudomonas pyocyanea* isolated from various pathological conditions (urinary infections, abscesses, osteoarticular infections, etc.) with different doses of gamma rays (500 r, 5000 r, 10,000 r, 100,000 r).

Strains maintained for 3,4 and 18 hours at 37°C were used. After irradiation for 5 to 30 minutes (according to the conditions of irradiation: distance between the radioactive source and the object, dosis administered), and after a "period of latency" ranging from 75 to 150 minutes, the strains were inactivated by heating at 60°C for one hour. "Lysogenicity" testing of the irradiated strains and the respective controls (same strains not irradiated) was performed versus indicator strains, in Petri dishes containing 2% agar, according to classic methods.

In 3 of the 20 strains irradiated with 500 r, qualitative differences were found to exist as compared to non-irradiated control strains, consisting in the presence of a free phage which was active on the indicator strains used. In another 2 irradiated strains, changes of the lysogenicity spectrum were found to have occurred.

As the dosis of gamma rays increases (5000 r, 10,000 r, 100,000 r), a definite inhibiting effect on the liberation and possible maturation of endogenous phage appears (as compared to the same non-irradiated control strains), especially in the case of young strains (3 to 4 hours).

The above observations suggest the significance of an optimal dosis of irradiation which, without killing all the germs, is apt to induce maturation of the "prophage" in the investigated strains.

Some suggestions are made with a view to continuing and extending the investigations concerning the "inducing action" of the "mutagenic" physical factor used.

OBSERVATIONS FAITES À L'OCCASION DE L'ÉTUDE DES CARACTÈRES DES RECHUTES ET RÉCIDIVES DANS LE TYPHUS EXANTHÉMATIQUE ÉPIDÉMIQUE EXPÉRIMENTAL CHEZ LE COBAYE

par

D. Combiesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section des Rickettsioses)

— Manuscrit reçu le 1 février 1960 —

Au cours des recherches entreprises sur la nature des récidives dans le typhus exanthématique épidémique, nous avons fait quelques observations que nous considérons intéressantes.

Le cobaye est un animal sensible au typhus exanthématique épidémique réagissant presque toujours par une maladie fébrile assez caractéristique, suivie d'une immunité persistante mais non définitive.

Réunissant les résultats obtenus sur 51 cobayes qui avaient fait un typhus exanthématique expérimental, nous avons constaté que seulement cinq de ces animaux ont fait une nouvelle infection après avoir reçu l'inoculation d'épreuve. Dans les mêmes conditions, trois autres ont présenté une immunité assez solide mais incomplète, leur maladie ayant duré en moyenne deux jours.

Le reste de 43 cobayes ont été complètement immuns. Leur résistance étant solide, ils ont supporté sans aucune réaction fébrile la réinoculation de 1/10—1/15-ème d'un cerveau de cobaye, sacrifié le quatrième jour de fièvre exanthématique.

Parmi les cobayes ayant fait une nouvelle maladie après la réinfection expérimentale, pas un seul n'avait contracté la première maladie (apparente) cinq mois auparavant. Un cobaye a réagi à l'inoculation d'épreuve faite cinq mois et demi après l'installation de l'apyrexie. Deux cobayes ont réagi à la réinfection faite après 10 mois, un autre après 11 mois et le dernier après 26 mois. Ceci prouve l'existence de différences individuelles dans l'établissement de l'immunité et dans la persistance de cette immunité chez le cobaye. Ces différences pourraient expliquer, au moins en partie, le comportement inégal des animaux au test d'immunité.

Un autre fait important qui se dégage de ces observations est le suivant: aucun des cobayes ayant subi une attaque de typhus exanthématique cinq mois avant l'injection d'épreuve, n'a réagi à cette dernière inoculation. Tous ont été trouvés immuns; ils représentaient la majorité des cobayes en expérience — soit 23 cobayes. Vingt de ces 23 animaux avaient fait le typhus exanthématique trois mois avant la réinfection expérimentale.

Ces expériences nous montrent que le typhus exanthématique expérimental chez le cobaye est suivi d'immunité; cette immunité peut durer chez certains animaux deux ans et même davantage. Des variations individuelles ne sont pas

rares, chez certains cobayes on peut reproduire une nouvelle attaque de typhus exanthématique après six, dix ou onze mois.

Dans les conditions habituelles de laboratoire dans lesquelles nous avons travaillé, tous les cobayes qui avaient subi l'infection rickettsienne, ont été trouvés immuns à l'inoculation d'épreuve faite un à cinq mois plus tard.

Un autre fait intéressant est à signaler: jusqu'à présent, on n'a pas décrit de typhus exanthématique spontané chez le cobaye; en effet cet animal ne s'infecte pas en cohabitant avec d'autres cobayes présentant un typhus exanthématique expérimental. On ne peut obtenir la maladie chez le cobaye qu'en lui inoculant la Rickettsia prowazeki provenant des poux infectés ou des produits pathologiques (sang, cerveau, etc.) récoltés d'un animal présentant une infection apparente ou inapparente.

Dans ces conditions, il aurait été intéressant de savoir si un cobaye guéri du typhus exanthématique expérimental peut oui ou non faire une rechute ou une récidive, et dans le cas affirmatif, à quel moment. La récidive ou rechute, dans ce cas, ne s'expliquerait que par la persistance des rickettsias dans l'organisme de l'animal, après guérison, dans le sens que lui attribue H. Zinsser, dans l'interprétation de la nature de la maladie de Brill (1).

Chez les cobayes qui ont fait la maladie expérimentale 60 à 90 jours auparavant, nous n'avons réussi à obtenir une rechute ou récidive en leur provoquant un traumatisme assez sévère, splénectomie (2) ou autre intervention mutilante. De même, nous n'avons observé chez ces animaux de récidives lors des injections avec d'autres germes qui déterminaient des réactions assez fortes.

Nous n'avons enregistré chez le cobaye, que quelques rechutes de typhus exanthématique sur lesquelles nous voulons insister.

Le 24 décembre 1953, nous avons administré au cobaye No. 1087, par voie intrapéritonéale, 1 ml d'une suspension préparée avec le cerveau d'un cobaye sacrifié le 5-e jour de maladie. Ce dernier animal (No. 1078) avait reçu, toujours par voie intrapéritonéale, 2,5 ml liquide sternal, obtenu par ponction, d'un malade de typhus exanthématique.

Après incubation de 7 jours, le cobaye No. 1087 a fait une ascension thermique, atteignant au bout de 5 jours 41°, la température revenant au normal (39,4°), cinq jours plus tard.

La température, restée normale seulement pendant 24 heures, a recommencé à monter, reproduisant, cette fois, l'aspect de la courbe thermique antérieure. La fièvre a de nouveau persisté pendant 11 jours; huit jours après qu'elle avait baissé, le cobaye a été saigné et avec ce sérum nous avons pratiqué la réaction de fixation du complément en présence d'un antigène rickettsien. La réaction a été positive, mais à un titre assez bas: 1/8. Au bout de 14 jours d'apyrexie, le cobaye a reçu l'inoculation d'épreuve (température contrôlée deux fois par jour). Après 9 jours d'incubation, il a fait une ascension thermique de 24 heures (40°), le reste du temps, la température restant normale.

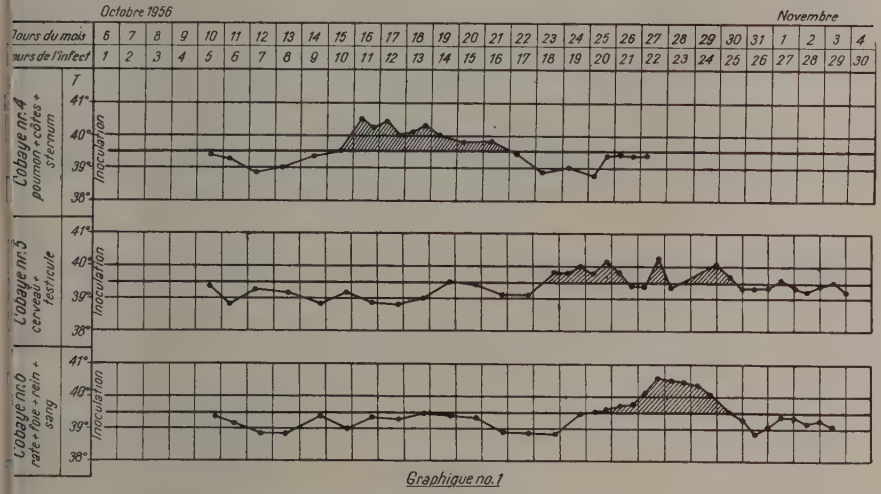
La réaction de fixation du complément, pratiquée un mois après l'inoculation d'épreuve (8 mars) a été négative.

On a de plus noté la température d'un autre cobaye (No. 1088), soumis au même traitement, qui a réagi normalement. A l'inoculation d'épreuve il a été trouvé immun. La réaction de fixation du complément, effectuée avant l'inoculation d'épreuve (8 mars, 1954) a donné un titre de 1/128, donc de beaucoup supérieur à celui obtenu chez le cobaye No. 1087, qui a présenté, le même jour, une réaction négative.

Au cours des recherches faites sur plusieurs milliers de cobayes, seulement eux ont montré un comportement similaire à celui observé chez le cobaye No. 1087.

Ainsi, un cobaye (No. 1086) a présenté, après 6 jours d'incubation, une fièvre caractéristique — d'une durée de 14 jours — suivie de 48 heures d'apyrexie, et ensuite d'une recrudescence qui a persisté 7 jours.

Le dixième jour d'apyrexie, l'animal a présenté la réaction de fixation du complément positive, au titre de 1/256. Ce cobaye n'a pas réagi à l'inoculation d'épreuve, pratiquée 12 jours plus tard.


Octobre 1956
Novembre
Jours du mois 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 1 2 3 4
Jours de l'infect 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Cobaye nr 4 poumon + côtes + sternum
Cobaye nr 5 cerveau + testicule
Cobaye nr 6 rate + foie + rein + sang
Inoculation
41°
40°
39°
38°

Graphique no. 1

Un autre cobaye (No 2169) a réagi d'une façon identique, au mois de juin 1955, après incubation de 5 1/2 jours. Nous avons constaté la recrudescence de la fièvre 36 heures après.

A l'occasion de l'étude de la répartition des Rickettsia prowazeki dans l'organisme des cobayes infectés expérimentalement, nous avons observé le phénomène suivant:

Chez les cobayes sacrifiés en pleine maladie — donc pendant la période fébrile — nous avons récolté séparément les différents organes. Dans la première expérience d'orientation, nous avons inoculé plusieurs animaux avec des suspensions obtenues avec le mélange des organes. Ainsi, un premier mélange contenait: poumon, côtes et sternum; le deuxième mélange: cerveau, surrénale et testicule, et le troisième: rate, foie et reins.

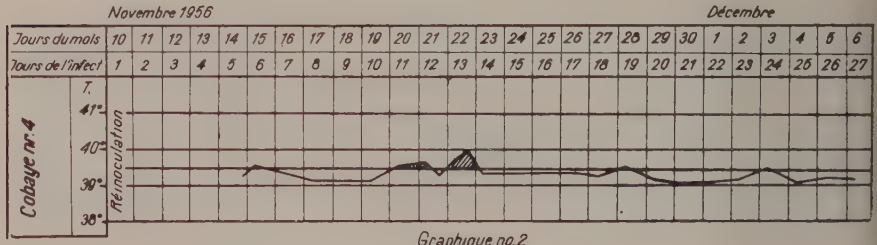
Il résulte d'une expérience plus démonstrative encore (Graphique 1) que la réaction des animaux était différente, en fonction uniquement du mélange inoculé.

Les cobayes qui ont reçu le mélange poumon, côtes, sternum, ont fait une maladie plus caractéristique, avec une période d'incubation plus courte (ex.: cobaye No. 4, Graphique 1).

Les cobayes injectés avec les autres mélanges ont fait une maladie avec incubation prolongée, évolution moins caractéristique et durée plus courte (ex.: cobayes Nos. 5 et 6, Graphique 1).

Les graphiques 2 et 3 montrent l'évolution de la courbe fébrile chez le cobaye No. 4 pour les deux injections d'épreuve, dont une pratiquée le 10 novembre 1956 et l'autre le 10 janvier 1957.

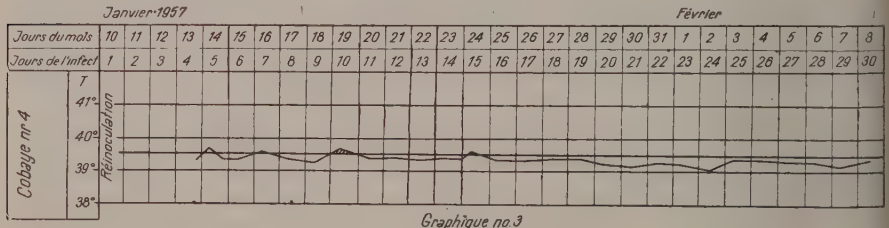
Partant de ces résultats, nous avons étudié sur un autre lot d'animaux l'infectiosité des différents organes, pris séparément, c'est-à-dire, un groupe d'animaux a été inoculé avec une suspension préparée uniquement avec le cerveau, un autre avec une suspension de poumon, et un troisième groupe, avec un mélange de côtes et sternum. Pour chaque groupe d'organes, on a ajouté



Graphique no. 2

2—10 ml d'eau physiologique, les animaux recevant la même quantité de divers organes: 1/2, 1/4, 1/10.

Les cobayes inoculés avec la suspension de poumon ont présenté une réaction caractéristique, tandis que les animaux inoculés avec les autres produits ont montré une courbe fébrile très peu caractéristique.



Graphique no. 3

Il résulte de ces expériences, que le poumon présente un degré plus élevé d'infectiosité et possède probablement, un plus grand nombre de Rickettsias.

Il reste à établir si la durée de la persistance des rickettsias dans l'organisme est en liaison avec ce phénomène.

*

La léthalité par le typhus exanthématique épidémique chez l'homme varie entre 6—8% et 60—70%, le chiffre le plus élevé a été observé pendant la guerre et la famine, chez les individus sous-alimentés.

L'observation a montré que la sous-alimentation favorise les épidémies. L'équilibre alimentaire favorise l'immunité, tandis que le déséquilibre affaiblit la défense de l'organisme. Chez l'homme, en état de sous-alimentation ou de déséquilibre alimentaire, les infections se développent facilement et sont souvent mortelles.

Il nous a semblé intéressant d'étudier le comportement des cobayes, soumis un régime de sous-alimentation, vis-à-vis de l'infection exanthématique expérimentale. Les cobayes étaient nourris d'avoine, foin, eau et très rarement une petite quantité de carottes ou betteraves. Ces cobayes sont morts, en grand nombre, avec état distrophique, perte d'appétit et diarrhée à la veille de la mort.

Trois de ces cobayes, de 240 à 250 gr chacun, ont été infectés, par voie cutanée, sans lésions préalables de la peau. Dans un travail antérieur (3) nous avons montré qu'il était possible d'obtenir une maladie apparente chez le cobaye par application de virus de typhus exanthématique épidémique, sur la peau normale, en doses de 4—5 gouttes de suspension virulente contenant du tissu pulmonaire de souris, par animal.

Le cobaye *r.b.* No. 1, après incubation de 6 jours, a fait une maladie apparente après avoir été infecté avec une souche de virus exanthématique, isolée d'un malade de l'hôpital Colentina (Souche Colentina).

Réinoculé le 16-ème jour du début de la convalescence avec une autre souche de virus exanthématique, isolée d'un malade de l'hôpital Berceni de Bucarest (Souche Berceni) après incubation de 6 jours, a refait la maladie.

Ce résultat suggère que la première maladie produite par le virus exanthématique — souche Colentina — n'a pu immuniser le cobaye contre la souche Berceni.

La deuxième maladie passée, nous avons réinfecté le même cobaye le 17-ème jour du début de la convalescence, avec la souche Colentina. Le cobaye a réagi de nouveau, preuve qu'il n'avait pas été immunisé par les deux maladies précédentes.

Les deux autres cobayes (*r.sp.* No. 2 et r. Cd. No. 3) se sont comportés de la même manière que le cobaye *r.b.*No.1: deux attaques de typhus exanthématique répété n'ayant pas suffi pour les immuniser contre une nouvelle réinfection.

L'infection exanthématique n'est généralement pas mortelle pour le cobaye, ce dernier ne succombant au typhus exanthématique expérimental que lorsqu'une infection secondaire s'associe à la maladie typhique.

Les résultats obtenus montrent, d'autre part, que les cobayes sous-alimentés ne sont pas capables de s'immuniser contre l'infection exanthématique expérimentale. Après un court intervalle, ils ont subi trois fois de suite la maladie. Les animaux débilités par la sous-alimentation et épuisés par les trois attaques de typhus exanthématique, ont fini par mourir.

Le régime de sous-alimentation a empêché l'installation de l'immunité contre le typhus exanthématique chez ces cobayes. L'expérience suivante en est la preuve.

Deux cobayes (No. 4 et No. 5) avec régime alimentaire complet, ont été infectés par voie cutanée, comme les trois cobayes précédents. Ils ont fait le typhus exanthématique après incubation de 8 et 9 jours. Seize jours après la chute de la température, chacun a reçu, par voie intrapéritonéale, 1/10-ème de cerveau de cobaye malade, sacrifié en plein état fébrile. Les deux cobayes immunisés par la première attaque n'ont pas réagi à cette injection d'épreuve.

Les différences de réaction entre les deux groupes de cobayes se traduisent premièrement, par une période d'incubation plus longue chez les cobayes à régime complet (8—9 jours au lieu de 6). Secondement, les cobayes soumis à un déséquilibre alimentaire ne parviennent pas à s'immuniser; ils ont réagi en faisant trois fois le typhus exanthématique, tandis que ceux à régime complet,

une fois guéris de la première infection, étaient immuns à une nouvelle inoculation de virus exanthématique. Ces cobayes ont été capables de s'immuniser.

L'observation des épidémiologues trouve une confirmation dans les résultats de nos expériences. La famine est habituellement suivie par une grave épidémie de typhus exanthématique, les deux fléaux se trouvant réunis dans les régions les plus éprouvées.

Donc les cobayes soumis à un régime alimentaire déséquilibré ne peuvent s'immuniser contre le typhus exanthématique expérimental. Les cobayes à régime complet, une fois guéris de la première infection, ont été trouvés immuns à une nouvelle inoculation de virus exanthématique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Le cobaye inoculé par différentes voies est un animal sensible au typhus exanthématique épidémique. Cette maladie lui confère une immunité qui, sans être définitive, peut persister plus de 2 ans chez certains animaux. Tous les animaux se sont montrés immuns à l'inoculation d'épreuve, effectués 1—5 mois après la maladie.

2. On n'a jamais constaté de typhus exanthématique spontané chez le cobaye. Cet animal vivant avec d'autres cobayes, infectés par voie expérimentale, ne contracte pas la maladie spontanément.

3. On n'a pu obtenir une rechute par traumatisme ou inoculation de germes virulents chez les cobayes ayant fait la maladie expérimentale 60 à 90 jours auparavant.

4. Sur quelques milliers de cobayes inoculés on a constaté seulement 4 rechutes survenues 24 à 48 heures après la disparition de la fièvre.

5. On a étudié la répartition des *Rickettsia prowazeki* dans l'organisme des cobayes infectés expérimentalement. L'infectiosité des divers organes récoltés chez les cobayes sacrifiés pendant la période fébrile, a été étudiée séparément, le poumon présentant le plus haut degré d'infectiosité.

6. Les cobayes soumis à un régime de sous-alimentation ne peuvent s'immuniser contre le typhus exanthématique expérimental, contractant trois fois la maladie. Les cobayes à régime alimentaire complet, guéris de la première infection, se sont montrés immuns à une nouvelle inoculation de virus exanthématique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zinsser H. — Am. J. Hyg., 1934. **20,** 513.
2. Combiesco D., Dumitresco N. et Cotăesco-Mănciulesco E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1948, **15,** 91.
3. Combiesco D., Zotta G., Cotăesco-Mănciulesco E. et Tascau E. — Bull. Acad. de Méd. de Roumanie, 1940—1941, **11,** 4 et 13.

НАБЛЮДЕНИЯ, ПРОВЕДЕННЫЕ В СВЯЗИ С ИЗУЧЕНИЕМ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗОБНОВЛЕНИЙ БОЛЕЗНИ И РЕЦИДИВОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СЫПНОМ ТИФЕ МОРСКИХ СВИНОК

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Морская свинка является восприимчивым животным по отношению к эпидемическому сыпному тифу, при заражении разными путями. Переболевшие животные проявляют стойкий, но не окончательный иммунитет; такой иммунитет может продержаться у отдельных животных в течении свыше 2 лет. Все свинки оказались устойчивыми при повторном заражении, проведенном спустя 1—5 месяцев после заболевания.

2. Нам не известен самопроизвольный сыпной тиф морских свинок. Морские свинки е заражаются самопроизвольно в условиях совместного содержания с другими свинками, которых вызвали экспериментальный сыпной тиф.

3. Не удалось наблюдать возобновление болезни, вызывая травматизм, или путем ведения вирулентных микроорганизмов, морским свинкам, переболевшим сыпным тифом а 60—90 дней раньше.

4. Среди нескольких тысяч зараженных морских свинок, только в трех случаях отмечено возобновление болезни через 1—2 сутки после падения лихорадки.

5. Исследовали распределение риккетсий Провачека в организме экспериментально раженных морских свинок. От забитых в течении лихорадки свинок брали разные органы, нфекциозность которых исследовалась отдельно. Выявлено, что легкие обладают инфекциозностью в наибольшей степени.

6. Свинки, получающие неполноценное питание не иммунизируются против экспериментального сыпного тифа; такие животные болели трехкратно сыпным тифом. Свинки, аходящиеся на полноценном питании, после выздоровления от перенесенной первой инекции, оказались устойчивыми по отношению к повторному введению сыпнотифозного ируса.

EOBACHTUNGEN GELEGENTLICH DES STUDIUMS VON RÜCKFÄLLEN UND REZIDIVEN DES EXPERIMENTELLEN EPIDEMISCHEN FLECKFIEBERS BEIM MEERSCHWEINCHEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Meerschweinchen stellen eine für epidemischen Fleckfieber empfängliche Tierart ar. Die Einimpfung des Erregers kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die Überstehung er Krankheit ist von einer Periode lange, aber nicht unbegrenzt, anhaltender Immunität folgt. Bei manchen Tieren kann sich diese Periode über mehr als zwei Jahre erstrecken. Bei —5 Monaten nach Überstehung der Krankheit durchgeführten Probeinfektionen, erwiesen ch alle Meerschweinchen als immun.

2. Das spontane Vorkommen von Fleckfieber bei Meerschweinchen ist uns nicht bekannt. ormale Tiere, die mit experimentell mit Fleckfieber infizierten Meerschweinchen zusammen halten werden, erleiden keine spontanen Ansteckungen.

3. Durch Trauma oder Einimpfung virulenter Keime konnte bei Meerschweinchen, e die experimentelle Krankheit 60—90 Tage vorher durchgemacht hatten, die Infektion cht zum Angehen gebracht werden.

4. Nur bei drei von einigen tausend experimentell infizierten Meerschweinchen konnten ückfälle, 24—48 Stunden nach Absinken des Fiebers, beobachtet werden.

5. Die Verteilung der *Rickettsia prowazeki* im Organismus experimentell infizierten eerschweinchen wurde untersucht. Von während der Fieberperiode getöteten Meerschweinen wurden verschiedene Organe entnommen und deren Infektiosität einzeln untersucht. ergab sich, dass die Lunge den höchsten Grad von Infektiosität aufweist.

6. Meerschweinchen, die Ernährungsstörungen ausgesetzt werden, erwerben keine mmunität gegen experimentelles Fleckfieber. Solche Tiere erkrankten dreimal hintereinander an Fleckfieber. Meerschweinchen, die eine vollwertige Nahrung erhalten, sind, wenn die erste Infektion einmal überstanden haben, gegen neuerliche Einimpfung des Fleckfiererregers immun.

BSERVATIONS MADE IN THE COURSE OF A STUDY CONCERNING RELAPSES AND RECIDIVATIONS OF EXPERIMENTAL EPIDEMIC TYPHUS IN THE GUINEA-PIG

SUMMARY

1. Guinea-pigs are susceptible to epidemic typhus when inoculated by various routes. imals which have recovered from the disease display a state of immunity which may persist a long period (over 2 years in some animals) but will not last indefinitely. All of the guineaigs were found to resist a challenging inoculation performed 1—5 months after the disease.

2. The spontaneous occurrence of typhus in the guinea-pig has not been recorded. When kept together with guinea-pigs in which typhus has been induced experimentally, normal animals do not contract the disease.

3. The disease could not be induced by experimental traumatization or inoculation of virulent germs to guinea-pigs which had suffered from the disease 60—90 days previously.

4. Out of several thousand inoculated guinea-pigs, only three had relapses 24—48 hours after the subsidence of fever.

5. The distribution of *Rickettsia prowazeki* in the body of experimentally infected guinea-pigs was investigated. Various viscera were collected from animals sacrificed during the feverish period, and their infectiousness was separately tested. The lung was found to display the highest degree of infectiousness.

6. Guinea-pigs subjected to dietary imbalance do not acquire immunity against experimental typhus. Such animals were repeatedly liable to contract the disease (three times). Guinea-pigs fed on a complete diet were immune to re-inoculation of the virus once they had recovered from the first infection.

ÉTUDE ENZYMOLOGIQUE COMPARATIVE DU *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BCG* ET SES VARIANTES RÉSISTANTES À LA STREPTOMYCINE, PAS ET INH

I. TRANSAMINASES
II. ENZYMES D'OXYDO-RÉDUCTION

par

EUGENIA SORU, MARIA ISTRATI, JUDITH SCULPTOREANU et MARIA PARASCHIVESCO

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section de Biochimie Générale — Laboratoire d'Enzymologie et Section du Vaccin BCG)

— Manuscrit reçu le 21 Novembre 1959 —

I. *Transaminases*

Un des mécanismes proposés pour expliquer l'action de l'isoniaside sur les mycobactéries a été celui de l'inhibition des systèmes enzymatiques, dont la composante coenzymatique est le pyridoxale phosphate (6, 11, 13).

L'antagonisme par analogie structurale a été ainsi invoqué comme facteur inhibiteur de ces systèmes enzymatiques, parmi lesquels les transaminases ont été le plus fréquemment discutées.

Dans le but de contrôler si l'action sur les transaminases est strictement caractéristique à l'isoniaside, nous avons entrepris une étude comparative de ces enzymes chez une souche de BCG sensible et la même souche adaptée aux différents antibiotiques à action spécifique sur les mycobactéries, en espèce sur des souches BCG isoniasido-résistantes, streptomycino-résistantes et PAS-résistantes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches microbiennes. Les souches BCG utilisées dans nos expériences ont été: une souche BCG standard, sensible aux antibiotiques et des souches rendues résistantes à l'isoniaside (250 gamma/ml), à la streptomycine (1000 gamma/ml) et PAS (500 gamma/ml). Les souches résistantes aux antibiotiques ont été obtenues par passages successifs de la souche sensible BCG (souche standard) sur le milieu Sauton additionné de quantités croissantes de l'antibiotique respectif. Les souches devenues résistantes sont conservées sur milieu Sauton supplémenté avec l'antibiotique respectif.

Préparation des cultures. Les cultures utilisées pour la détermination des transaminases ont été obtenues par passages des cultures stock décrites antérieurement sur le milieu Sauton sans antibiotiques. On a examiné les cultures correspondant aux différentes phases de croissance du germe (cultures de 7, 14 et 19 jours), l'activité enzymatique présentant une nette variation en fonction de ces phases. Les cultures examinées devaient présenter un rythme de croissance très analogue, condition nécessaire pour une étude comparative.

Préparation des suspensions microbiennes. Les germes correspondant aux différentes phases de croissance et aux différentes souches sont séparés et lavés plusieurs fois à l'eau bidistillée. Les germes ainsi débarrassés de toute trace de milieu de culture sont mis en suspension dans de l'eau bidistillée par homogénéisation ménagée à l'aide d'un homogénisateur en verre (type Potter). La densité microbienne est déterminée par évaluation du poids sec correspondant à 1 cc de la suspension des germes.

Détermination de l'activité transaminasique. On a déterminé l'activité transaminasique asparto→α-cétoglutarique, glutamo→oxaloacétique, glutamo→pyruvique, alanino→α-cétoglutarique, alanino→oxaloacétique. On a utilisé les germes en suspension aqueuse, préparée de la manière décrite, donc à l'état de « resting bacteria ».

En tenant compte de l'observation de HALPERN et GROSSOVICZ que l'addition d'un détergeant favorise la mise en évidence de l'activité transaminasique chez le BCG (8), nous avons introduit dans les systèmes à examiner du Na-désoxycholate. Nos déterminations ont été effectuées simultanément et dans des conditions expérimentales identiques pour toutes les souches contrôlées: BCG sensible, BCG isoniasido-résistant (250 gamma/ml), streptomycino-résistant (1000 gamma/ml) et PAS-résistant (500 gamma/ml). Le schéma expérimental applicable à toutes nos déterminations comprend l'organisation suivante:

suspension microbienne : 1 ml (50 mg germes exprimés en poids sec)
amino-acides : 0,5 ml (20 μ M)
cétoacides : 0,5 ml (20 μ M)
Na-désoxycholate : 0,5 ml (d'une solution 0,5%)
tampon phosphate (pH 8,2): 0,5 ml (M/20)

Les solutions des aminoacides et des cétoacides sont préalablement neutralisées.

Les systèmes témoins utilisés dans nos expériences contiennent, au lieu des germes vivants, les mêmes germes préalablement inactivés par chauffage (60 minutes à 100°). L'activité transaminasique des germes est laissée à évoluer à 37° et en absence de l'air (tubes Thunberg ou exsiccateur de vide). Après 18 heures d'incubation l'activité transaminasique correspondant aux différents systèmes est vérifiée par contrôle chromatographique du surnageant de centrifugation. La chromatographie a été effectuée sur papier filtre Whatman No. 1 dans le système classique butanol-acide-acétique-eau (40:10:50) et révélation à la ninhydrine. Le dosage des aminoacides résultés par le processus de transamination a été effectué par transformation du complexe ninhydrique de chaque aminoacide séparé sur le chromatogramme en complexe de cadmium (3), découpage de la tache colorée, extraction dans du méthanol du complexe coloré et photométrie en rapport avec les aminoacides témoins, soumis aux mêmes manipulations.

RÉSULTATS

Les résultats de nos expériences sont résumés dans le graphique et le tableau I. Le graphique No. 1 résume les valeurs absolues de l'activité transaminasique des différentes variantes BCG (sensibles et résistantes aux antibiotiques), exprimée en gamma aminoacide nouvellement synthétisé par 1 mg de germes. Le tableau I exprime l'activité transaminasique des différentes souches en valeurs relatives par rapport à l'activité transaminasique de la souche standard BCG sensible, considérée égale à 100. L'examen de ces valeurs nous indique les faits suivants:

Tableau I

Activité transaminasique comparative du « Mycobacterium tuberculosis », variantes BCG — sensibles et variantes résistantes aux antibiotiques PAS, streptomycine et INH.

(Exprimée en pourcentage de l'activité correspondant à la variante BCG sensible d'origine et considérée égale à 100)

Systèmes	Asparto → α-cétoglutarate			Alanino→ α-cétoglutarate			Glutamo→ pyruvate			Glutamo→ oxaloacétate		
Âges des cultures (jours)	7	14	19	7	14	19	7	14	19	7	14	19
Souches												
B.C.G. sensible aux antibiotiques	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	0
B.C.G.-PAS-résistante	107	111	155	78	152	196	230	0	0	203	0	0
B.C.G. streptomycinorésistante	40	37	63	36	34	13	175	0	0	166	0	0
B.C.G.-INH-résistante	47	49	70	24	44	15	175	0	0	187	0	0

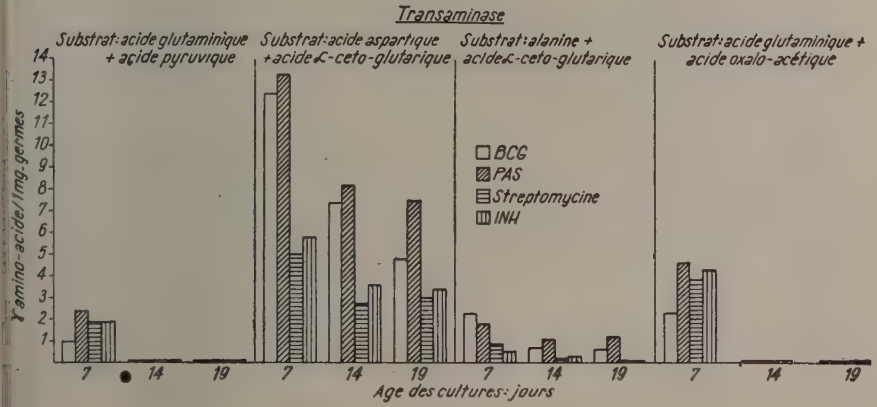


Fig. 1

1) l'activité transaminasique de toutes les souches examinées varie en fonction de la phase de croissance du germe. L'activité la plus intense correspond à la phase de lag (culture de 7 jours);

2) pour toutes les variantes, l'activité transaminasique, de beaucoup la plus intense, correspond à l'asparto → α-cétoglutarate transaminase. L'activité de cette transaminase se manifeste pour toutes les phases de croissance des germes. L'activité transaminasique glutamo → pyruvique et glutamo → oxaloacétique se manifeste seulement chez les germes se trouvant dans leur phase de lag (culture de 7 jours), elle disparaît chez les germes se trouvant dans leur phase de croissance exponentielle ou dans leur phase de déclin (cultures de 14 et 19 jours). L'activité transaminasique alanino → oxaloacétique est presque nulle pour toutes les phases de la croissance des germes;

3) l'induction de la résistance du BCG à la streptomycine et à l'INH est accompagnée d'une forte diminution de l'activité asparto → α-cétoglutarate transaminasique et de l'alanino → α-cétoglutarate transaminasique. L'induction de la résistance au PAS produit, au contraire, un effet stimulant de l'activité de ces mêmes enzymes;

4) l'induction de la résistance du BCG à la streptomycine, INH et PAS est accompagnée d'une nette orientation de l'activité transaminasique dans le sens de la transamination *glutamo → pyruvique* et respectivement *glutamo → oxaloacétique*. Il est à préciser que cette orientation a probablement un rôle spécial, car elle se manifeste seulement dans la phase de lag (culture de 7 jours), tandis que l'orientation transaminasique asparto → α-cétoglutarique se manifeste dans toutes les phases de croissance des germes.

DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Le problème des mécanismes biochimiques impliqués dans l'apparition de la résistance aux antibiotiques, donc impliqués dans l'action des antibiotiques, constitue une préoccupation prédominante et qui se manifeste par un nombre impressionant de recherches dans cette direction. Aucune de ces recherches n'a pas encore abouti à une conclusion unique et définitive, ce qui indique la complexité du phénomène et impose la continuation des recherches orientées vers l'étude comparative des processus métaboliques partiels, cependant fondamentaux, chez les variantes sensibles et les variantes correspondantes, à résistance induite. L'étude des transaminases comme mécanisme crucial du métabolisme azoté a, dans ce sens, une importance spéciale (4, 5). L'interprétation de l'action de l'INH sur les mycobactéries comme étant une action de type compétitif, par analogie structurale avec le pyridoxale-5-phosphate, coenzyme de la transaminase, admise par quelques auteurs (6), est combattue par d'autres (19).

Les résultats que nous relatons dans ce travail, indiquant que les modifications de l'activité transaminasique ne sont pas caractéristiques pour l'action de l'INH mais analogues aux modifications induites par la streptomycine, ne peuvent pas être expliqués comme suite d'une action de type compétitif en rapport avec le pyridoxale-5'-phosphate, coenzyme des transaminases. En même temps les modifications induites par le PAS, un autre antibiotique très spécifique pour les mycobactéries, apparaissent dans le sens d'une stimulation des transaminases asparto → α-cétoglutarique et alanino → α-cétoglutarique et non dans celui d'une inhibition, comme dans le cas de la streptomycine et de l'INH.

Cette différence de l'effet des divers antibiotiques sur l'activité transaminasique, qui conduit à la synthèse de l'acide glutamique chez le BCG, suggère qu'au niveau de cette synthèse les antibiotiques peuvent manifester un mécanisme d'action différent.

Un tout autre aspect apparaît si l'on examine le processus de transamination réversible, c'est-à-dire la transamination conduisant à la dégradation de l'acide glutamique sous l'action de la transaminase glutamo→pyruvique et glutamo→oxaloacétique. Ces transaminases n'apparaissent chez les variantes BCG que dans la phase de lag et disparaissent dans la phase exponentielle et la phase de déclin. L'induction de la résistance à la streptomycine, au PAS et INH est accompagnée d'une nette stimulation de cette voie de dégradation de l'acide glutamique. L'effet stimulant est commun aux trois antibiotiques spécifiques des mycobactéries, ce qui indique une action commune à ces antibiotiques au niveau de la dégradation par transamination de l'acide glutamique. Il est donc probable qu'un

es mécanismes, important et commun aux antibiotiques spécifiques des myco-actéries, soit la stimulation de la dégradation de l'acide glutamique, donc une ction d'appauvrissement de la cellule microbienne en ce composant important. 'et appauvrissement est réalisé, d'ailleurs, aussi par l'action d'inhibition de la ynthèse de l'acide glutamique constaté chez les variantes résistantes à la strep-omycine et à l'INH. Seul le PAS stimule en même temps la synthèse et la dégra-ation de l'acide glutamique, mais pour ce même antibiotique la dégradation st beaucoup plus intensément stimulée que la synthèse.

L'effet total des antibiotiques sur l'activité des différentes transaminases, npliquant tant la synthèse que la dégradation de l'acide glutamique, se manifeste onc par un appauvrissement final de la cellule en acide glutamique, composante ruciale du métabolisme azoté.

Ces données expérimentales sont en concordance avec les recherches de ALE (7) qui attribue l'action des antibiotiques sur le staphylocoque comme inter-rant avec la perméabilité de ce germe pour l'acide glutamique.

II. *Étude de la respiration et des enzymes d'oxydo-réduction.*

Les processus oxydatifs d'une cellule microbienne sont des indicateurs de rande sensibilité des modifications métaboliques ayant lieu dans cette cellule. eci explique le grand nombre de recherches orientées vers l'étude de ces proces-is chez les germes modifiés par suite de l'apparition du phénomène de la résis-nce aux antibiotiques.

L'étude des enzymes héminiques: catalase (10), péroxydase (1,9) et cyto-romeoxydase (2,15) chez les Mycobactéries, adaptées à l'INH ont indiqué la erte totale ou une importante diminution de l'activité de ces enzymes.

Cette action est-elle propre à l'INH ou bien se trouve-t-elle chez les autres ntibiotiques spécifiques des Mycobactéries, en espèce à la streptomycine et au AS? Pour répondre à cette question nous avons entrepris une étude comparative u comportement de ces enzymes chez les variantes INH-résistantes, streptomy-no-résistantes et PAS-résistantes, obtenues d'une même souche de BCG sensible ux antibiotiques mentionnés. Pour avoir une image plus complète de leur méta-olisme oxydatif, les mêmes variantes ont été examinées aussi bien du point e vue de leur capacité respiratoire endogène que de leur capacité déhydrogéna-que envers des substratums très variés.

RÉSULTATS

Catalase. L'activité catalasique (méthode Joles (17)) des germes varie pour utes les variantes, en fonction de la phase de croissance des germes, l'activité plus intense correspondant aux cultures de 14 jours, la plus faible aux cultures e 7 jours.

Par suite de l'adaptation aux différents antibiotiques utilisés par nous (INH, reptomycine, PAS) l'activité catalasique est intensément réduite. Elle est itensément réduite et même complètement abolie chez la variante INH-résis-nte, fait qui a été signalé par toutes les recherches antérieures (10, 12, 14), ais cette activité est aussi intensément réduite par suite de l'adaptation ux autres antibiotiques spécifiques des Mycobactéries, streptomycine et rtout PAS (Graphiques 2 et 3). La réduction la plus intense de l'activité atalasique correspond pour tous ces antibiotiques à la phase de croissance pour quelle l'activité catalasique de la souche sensible standard de départ est la us intense.

L'adaptation du BCG aux différents antibiotiques spécifiques des Mycobactéries modifie donc dans le même sens l'activité catalasique, les différences étant seulement d'ordre quantitatif, l'INH réalisant la plus intense réduction et parfois même l'abolissement total de cette activité. L'adaptation au PAS se manifeste de même par une intense réduction de l'activité de ce même enzyme (pourcentage de réduction 83—87). L'adaptation à la streptomycine réduit l'activité catalasique dans une moindre proportion (pourcentage de réduction 27—71).

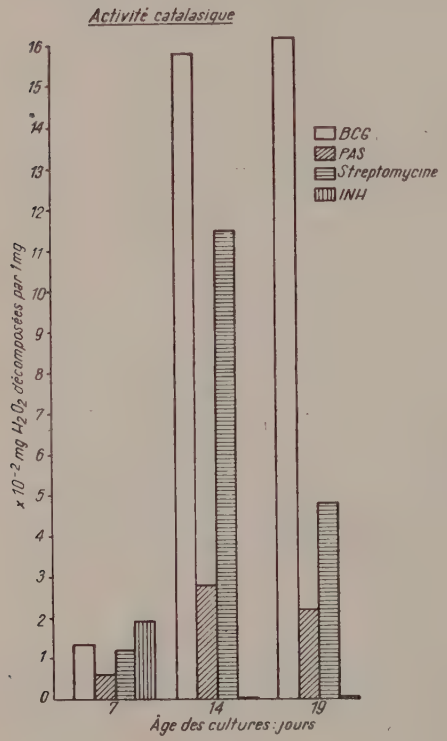


Fig. 2

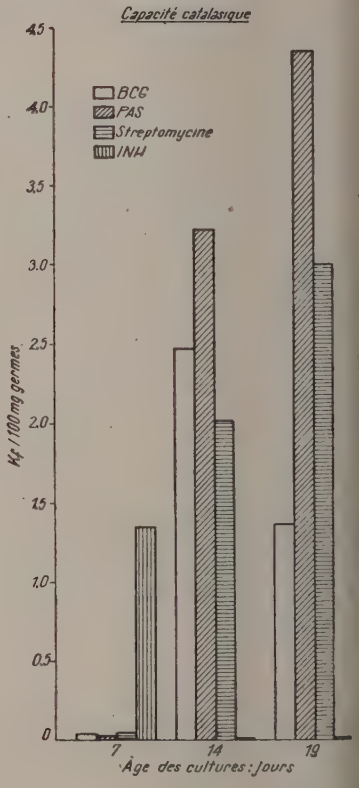


Fig. 3

Péroxydase. (Méthode de Willstätter (17)). Les recherches d'ANDREYEW et coll. (1) ont mis en évidence l'abolissement presque total de l'activité péroxydasique de la variante BCG adaptée à l'INH. Les résultats de nos recherches confirment cette action et indiquent en même temps qu'elle est plus spécifique au processus d'adaptation à l'INH que la réduction de l'activité catalasique. En effet, l'activité péroxydasique est très peu modifiée par l'adaptation aux autres antibiotiques spécifiques des Mycobactéries, streptomycine et PAS, tandis que l'activité catalasique est intensément modifiée aussi par ces antibiotiques (graphique 4).

L'abolissement de l'activité péroxydasique constitue donc une caractéris-ique plus spécifique de l'action de l'INH que l'abolissement de l'activité atalasique.

Cytochromeoxydase (méthode de STOTZ (18)). Des recherches antérieures 2, 15) ont mis en évidence une réduction de l'activité de la cytochromeoxydase hez le BCG adapté à l'INH. Les ésultats des expériences com-aratives relatés dans ce mémoire ndiquent en même temps, que adaptation au PAS produit, de ême que l'adaptation à l'INH, ne réduction de l'activité cy-ochromeoxydasique, mais que adaptation à la streptomycine roduit au contraire un faible ccroissement de l'activité de e même enzyme (graphique 5).

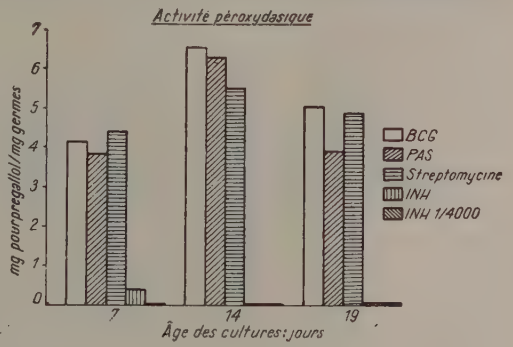


Fig. 4

Respiration. La respiration néthode manométrique de Warburg) endogène de toutes s variantes adaptées aux antibiotiques est moins intense que la respi-ation de la souche BCG standard de départ. Cette réduction est plus intense chez variante streptomycino-résistante (graphique 6).

Déhydrogénase. En utilisant comme indicateur d'oxydo-réduction le tri-hényltétrazoliumchloride (TTC) (16), on a contrôlé les déhydrogénases corres-pondant aux substratums suivants: saccharose, galactose, glucose, glycérol, acide ctique, acide succinique, acide pyruvique, acide glutamique, alanine, acide éarique, acide linoléique et palmitique. Les résultats de nos déterminations 'indiquent pas une influence pouvant constituer une caractéristique de l'action es différents antibiotiques sur ces enzymes (tabl. II).

La *glycéroldéhydrogénase* est plus active chez les variantes adaptées aux antibiotiques et surtout chez la variante INH-résistante récoltée d'une culture en milieu Sauton, supplémentée de 250 γ INH/ml.

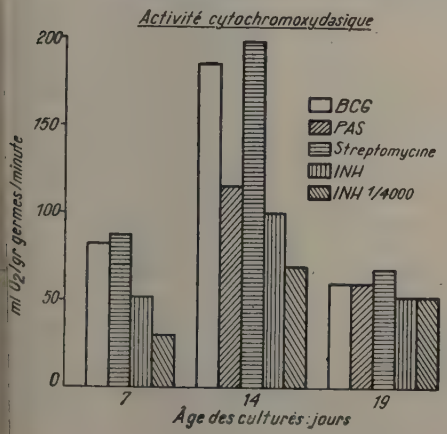


Fig. 5

La glucosedéhydrogénase, galactose — et *saccharose-déhydrogénase* sont influencées de manière très différente, en fonction de la phase de croissance du germe et sans présenter un aspect très caractéristique.

Un aspect commun aux différentes variantes et aux différentes déhydrogénases est l'accroissement de l'activité enzymatique chez les cultures plus âgées (14 jours et surtout 19 jours).

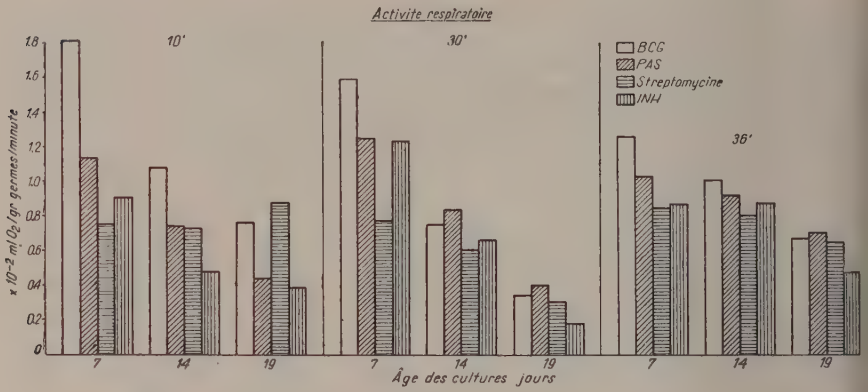


Fig. 6

Tableau II

Activité déhydrogénasique du BCG et ses variantes résistantes au PAS, streptomycine et INH (exprimée en pourcentage de l'activité du BCG sensible, considérée égale à 100)

Souches	BCG			PAS			Streptomycine			INH			INH(4000 γ /ml)		
Jours	7	14	19	7	14	19	7	14	19	7	14	19	7	14	7
Témoins	100	100	100	85	132	174	92	168	135	40	102	160	57	102	109
Saccharose	100	100	100	64	115	76	85	168	120	60	95	158	108	136	162
Galactose	100	100	100	107	90	126	110	112	97	94	85	124	169	120	168
Glucose.....	100	100	100	95	103	126	95	130	80	81	87	122	90	65	118
Glycérol	100	100	100	104	123	112	122	129	139	140	91	151	154	97	200
Ac. lactique	100	100	100	100	100	100	103	116	105	92	83	102	113	121	145
Ac. succinique..	100	100	100	92	100	88	100	102	93	86	72	95	109	79	165
Ac. pyruvique..	100	100	100	97	101	84	96	183	109	87	96	106	110	90	103
Ac. palmitique..	100	100	100	102	136	122	98	106	14	83	60	74	71	92	55
Ac. stéarique ..	100	100	100	90	93	92	82	73	50	77	69	57	77	74	69
Ac. linoléique ..	100	100	100	70	94	200	38	100	57	50	69	150	34	79	121
Ac. glutamique	100	100	100	126	130	190	131	235	153	194	152	243	245	191	173
Alanine	100	100	100	137	116	113	85	113	111	54	73	132	126	78	170

La lactodéhydrogénase n'est pas modifiée par suite de l'adaptation au PAS, très peu intensifiée par suite de l'adaptation à la streptomycine et très peu réduite par suite de l'adaptation à l'INH. Cette dernière variante (résistante à 250 γ INH/ml), réintroduite dans le milieu Sauton contenant de l'INH (250 γ/ml) manifeste une intensification de l'activité lactodéhydrogénasique. Cet aspect se retrouve chez la succinodéhydrogénase (culture de 19 jours).

La glutamodéhydrogénase est très intensifiée chez les variantes résistantes surtout chez les cultures de 19 jours.

L'alaninedéhydrogénase est modifiée de manière analogue.

L'augmentation de l'activité de ces déhydrogénases indique une métabolisation dégradative plus intense de l'acide glutamique et de l'alanine chez les variantes devenues résistantes aux antibiotiques.

CONCLUSIONS.

I. *Transaminases.* La détermination de l'activité enzymatique de l'asparto → -cétoglutaro-transaminase, l'alanine → α-cétoglutaro-transaminase, glutamo → yruvo-transaminase, glutamo→oxaloacéto-transaminase chez Mycobacterium CG, sensibles et rendus résistants à la streptomycine, l'INH et PAS, nous indique ne diminution de la capacité de synthèse par transamination de l'acide glutaique et un accroissement de la capacité de dégradation par transamination e ce même aminoacide, comme suite de l'apparition de la résistance aux antiiotiques mentionnés.

L'effet total de ces antibiotiques sur l'activité transaminasique conduit, ar l'effet inhibiteur de la synthèse de l'acide glutamique, de même que par leur effet imulant la dégradation de ce même aminoacide, à l'appauvrissement de cellule en acide glutamique, composante cruciale dans le métabolisme azoté e la cellule.

II. Enzymes d'oxydoréduction. L'étude comparative des hémenzymes: talase, péroxydase, cytochromeoxydase, de même que des différentes déhydroénases et de la respiration endogène chez le BCG sensible et ses variantes résisntes à l'INH, PAS et streptomycine, nous indique comme effet caractéristique e l'INH l'abolition de l'activité péroxydasique, cet enzyme étant très peu modifié ur suite de l'apparition de la résistance aux autres antibiotiques (streptomycine PAS).

L'action de réduction de l'activité catalasique et cytochromeoxydasique, uoique à intensité variable, est tout de même commune aux trois antibiotiques udiés par nous.

La respiration et l'activité déhydrogénasique, quoique modifiée sous l'action e ces antibiotiques, ne constitue un critérium différentiel de l'action des trois ntibiotiques contrôlés par nous (INH, PAS et streptomycine).

BIBLIOGRAPHIE

. ANDREYEW A., CH. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET: Ann. Inst. Pasteur 1956, **91,** 586.
. ANDREYEW A., CH. GERNEZ-RIEUX et A. TACQUET: Ann. Inst. Pasteur 1957, **93,** 281.
. BARROLIER J. — Naturwiss. 1955, **42,** 416.
. BRAUNSTEIN A. E. et KRITZMAN M. G. — Biohimiya 1937, **2,** 242, 859: Enzymologia 1937, **2,** 129.
. BRAUNSTEIN A. E. — Advanc. Enzymol., 1957, **19,** 335. Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna 1958. Pergamon Press, London.
. CYMERMAN-CRAIG J., S. D. RUBBO, D. WILLIS et J. EDGAR. — Nature, Lond., 1955, **176,** 34.
. GALE E. F. — Advances in Protein Chemistry 1953, **8,** 283.
. HALPERN Y. S. et GROSSOWICZ N. — Bull. Res. Council Israel 1956, 6E, 21.
. KRUGER-THIEMER et EKKEHARD. — Amer. Rev. Tuber. 1958, **77,** 364.
. MIDDLEBROOK G. — Amer. Rev. Tuberculosis, 1954, **69,** 471.
. ITO F. et SUGANO. T. — Kekkaku 1954, **28,** 161.
. PERŞIN G. N. et ZIKOVA T. N. — Problemî tuberkuleza 1958, 7, 83.
. SAKAI I. — Kekkaku, 1954, **29,** 161.
. SMOLENSKAIA A. Z.: Problemî tuberkuleza 1958, 8, 74.
. SORU E. et ISTRATI M. — Naturwiss. 1958, **45,** 578.
. SORU E. et STERNBERG M. — Revue de Chimie Acad. R.P.R. 1957, **2,** 299.
. SUMNER B. J. et SOMERS F. — Chemistry and Methods of Enzymes, 1947. Acad. Press Inc. Publishers. New York.
. STOTZ E. — J. biol. chem. 1939, **131,** 555.
. YOUATT J. — Biochem. J., 1958, **68,** 193.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ Mycobacterium tuberculosis Б. Ц. Ж. и ЕГО ВАРИАНТОВ УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕПТОМИЦИНУ ПАСК И ИНГ

I ТРАНСАМИНАЗЫ

П. ИЗУЧЕНИЕ ДЫХАНИЯ И ОКИСЛЯЮЩЕ—ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭНЗИМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Трансаминазы. Определение энзиматической деятельности аспарто — α — цетоглютамо-трансаминазы, аланина — α-цетоглютамо-трансаминазы, глютамо-пируво-трансаминазы, глютамо-оксалацето-трансаминазы у микобактерий Б.Ц.Ж. чувтствительных к стрептомицину, ПАСК и ИНГ и с вызванной устойчивостью против данных препаратов, показывает снижение способности к синтезу путем трансаминации глютаминовой кислоты и повышение способности к распаду путём трансаминации этой же аминокислоты, в результате возникновения устойчивости по отношению к исследуемым антибиотикам.

Тотальное действие данных антибиотиков на трансаминазную деятельность ведет как путём тороможения синтеза глютаминовой кислоты, так и путём стимуляции распада дан ной аминокислоты, к уменьшению содержания в клетке глютаминовой кислоты — соединние, играющее решительную роль в азотистом обмене клетки.

2. *Изучение дыхания и окисляюще-восстановительных энзим.* Сравительное изучение гемензим; каталаза. пероксидаза, цитохромоксидаза, также как и разных дегидрогеназ и эндо генного дыхания палочки Б.Ц.Ж. чувствительной к ИНГ, ПАСК и стрептомицину и ее вариантов, устойчивых по отношению к данным антибиотикам, показало, что характерное действие ИНГ сказывается в прекращении пероксидазной деятельности; появление устойчивости к другим антибиотикам (стрептомицин и ПАСК) влияет в самой меньшей степени на данную энзиму.

Снижение каталазной и цитрохромоксидазной деятель ности является общим явлением для всех 3 изучаемых антибиотиков, хотя проявляется в разной степени.

Несмотря на то что дыхание и дегидрогеназная деятельность меняются под влиянием данных антибиотиков, все же эти деятельности не могут служить в качестве критерия для дифференциации действия изучаемых 3-ех антибиотиков (ИНГ, ПАСК и стрептомицин).

VERGLEICHEND-ENZYMOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BCG* UND SEINER GEGEN STREPTOMYCIN, P.A.S. UND I.N.H. WIDERSTANDSFÄHIGEN VARIANTEN.

I. TRANSAMINASEN

II. UNTERSUCHUNG DER ATMUNG UND DER OXYDOREDUZIERENDEN ENZYME.

ZUSAMMENFASSUNG

I. *Transaminasen.* Bestimmungen der enzymatischen Aktivität der Asparto→alpha-Ketoglutarsäure-Transaminase, Alanin→alpha-Ketoglutarsäure-Transaminase, Glutamo→Brenztraubensäure-Transaminase und der Glutamo-Oxalessigsäure-Transaminase bei empfindlichem *Mycobacterium* B.C.G., sowie bei Varianten mit erworbener Widerstandsfähigkeit gegen Streptomycin, P.A.S. und I.N.H., ergaben, dass, infolge des Auftretens der Widerstandsfähigkeit gegen die Antibiotika, eine Abnahme der Fähigkeit Glutaminsäure durch Transaminierung zu synthetisieren und eine Erhöhung der Fähigkeit diese Aminosäure durch Transaminierung abzubauen eintritt.

Die Gesamtwirkung dieser Antibiotika auf die Transaminaseaktivität führt, sowohl durch aktive Hemmung der Glutaminsäuresynthese, als auch durch Anregung des Abbaus derselben Aminosäure, zu einer Verarmung der Zelle an Glutaminsäure, d.h. an einer Substanz die im zellulären Stoffwechsel des Stickstoffes eine überaus bedeutende Rolle spielt.

II. *Untersuchung der Atmung und der oxydoreduzierenden Enzyme.* Aus einer vergleichenden Untersuchung der Haemenzyme Katalase, Peroxydase und Cytochromoxydase, sowie der verschiedenen Dehydrogenasen und der endogenen Atmung bei empfindlichem B.C.G. und bei seinen gegen I.N.H., P.A.S. und Streptomycin widerstandsfähigen Varianten ergab sich, dass die Aufhebung der Peroxydaseaktivität eine, für I.N.H. charackteristische Wirkung darstellt. Dasselbe Enzym ist bei gegen andere Antibiotika (Streptomycin und P.A.S.) erworbener Widerstandsfähigkeit kaum verändert.

Eine herabsetzende Wirkung auf die Katalase — und Cytochromoxydaseaktivität kommt, wenn auch in schwankendem Ausmass, allen drei untersuchten Antibiotika zu.

Obwohl die Atmung und Dehydrogenaseaktivität sich unter der Einwirkung der angegebenen Antibiotika ändern, stellen sie doch kein differentielles Kriterium der Wirkung der drei untersuchten Antibiotika dar (INH, PAS und Streptomycin).

A COMPARATIVE ENZYMOLOGICAL STUDY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BCG* AND OF ITS STREPTOMYCIN −, PAS − , AND INH-RESISTANT VARIANTS.

I. TRANSAMINASES
II. A STUDY OF RESPIRATION AND OF OXIDOREDUCING ENZYMES.

SUMMARY

I. *Transaminases.* The enzymatic activities of aspartic → alpha-cetoglutaric acid transaminase, alanine→alpha-cetoglutaric acid transaminase, glutamic→pyruvic acid transaminase and glutamic-oxalacetic acid transaminase were determined in sensitive *Mycobacterium* B.C.G. and in variants having acquired resistance to streptomycin, INH, and PAS. The ability of synthesizing glutamic acid by transamination was found to have decreased and the ability of degrading the same amino-acid by transamination to have increased as a consequence of the acquirement of resistance to the investigated antibiotics.

Due to active inhibition of glutamic acid synthesis as well as to stimulation of the degradation of the same amino-acid, the total effect of these antibiotics as regards transaminase activity consists in glutamic acid depletion of the cell, in the nitrogen metabolism of which this compound is known to play an essential part.

II. *A Study of Respiration and of Oxidoreducing Enzymes.* A comparative study of the haemenzymes catalase, peroxidase, cytochrome oxidase as well as of the various dehydrogenases and of endogenous respiration in sensitive B.C.G. and its INH−, PAS−, and streptomycin-resistant variants shows the characteristic effect of INH to consist in an abolishment of peroxidase activity, while this enzyme is very little altered following the appearance of resistance to other antibiotics (streptomycin and PAS).

A reduction of catalase and cytochrome oxidase activity is common to all 3 antibiotics investigated, although in a variable degree.

Although respiration and dehydrogenase activity are altered under the influence of the antibiotics under investigation, they do not afford a differential criterion for the actions of these 3 antibiotics (INH, PAS, and Streptomycin).

ÉVOLUTION DES AGGLUTININES DANS LES LEPTOSPIROSES HUMAINES. VALEUR DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION-LYSE DANS LA DÉTERMINATION DU TYPE ÉTIOLOGIQUE

par

D. Combiesco, Nina Sturdza, M. Sefer et A. Klipper

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Leptospiroses).

— Manuscrit reçu le 29 décembre 1959 —

Le diagnostic des leptospiroses par la réaction d'agglutination-lyse (RAL) pratiquée aujourd'hui dans tous les laboratoires spécialisés a permis de signaler de nombreux cas. L'emploi d'un grand nombre de types, sérologiquement différents, permet le dépistage d'une grande variété de types pathogènes. Néanmoins, cette réaction ne donne pas toujours des résultats concluants, ni en ce qui concerne le titre indicateur de la maladie, ni relativement à la détermination du sérotype qui a provoqué l'infection. Des cas de leptospiroses, confirmés par l'isolement du germe, peuvent être accompagnés d'agglutinines sous le titre 1/400, ou même évoluer sans production d'agglutinines (3,5).

D'autre part, les réactions paradoxales (agglutination au même titre pour plusieurs sérotypes, ou titre maximum pour les coagglutinines) empêchent dans certains cas la détermination du type étiologique. Le contrôle de l'évolution des anticorps agglutinants est un moyen de préciser le sérotype, mais, malheureusement, souvent les malades ont déjà quitté l'hôpital lorsque les premiers résultats sérologiques sont obtenus, et parfois les réactions paradoxales persistent longtemps après le début de la maladie.

L'isolement de la souche, représente le moyen le plus sûr pour déterminer le leptospire en cause, mais comme les malades tardent souvent à s'interner, la majorité des statistiques se basent sur le typage par la RAL.

Dans le présent travail, nous poursuivons l'apparition et l'évolution des agglutinines et coagglutinines chez 261 malades, soumis à des examens sérologiques répétés, et essayons de poser le diagnostic du type sérologique par la RAL à différents intervalles après le début de la maladie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Entre les années 1955 et 1957 nous avons poursuivi l'examen sérologique (réactions répétées d'agglutination-lyse) de 261 cas de leptospirose clinique — un total de 722 épreuves sérologiques. Sur 261 malades, 54 ont été examinés dès la première semaine, 174 à partir de la seconde, et 25 à partir de la troisième semaine. Dans huit cas, le premier examen a été effectué à peine à partir de la quatrième et cinquième semaine de maladie.

Afin de pouvoir suivre l'évolution des anticorps agglutinants, nous avons classé les résultats obtenus en fonction de l'intervalle écoulé depuis le début

de la maladie comme suit: I-e, II-e, III-e, IV-e semaine jusqu'à 2 mois, 3 à 6 mois, 7 à 12 mois et 2 années.

Dans la réaction d'agglutination-lyse nous nous sommes servis seulement de 6 types de leptospires sérologiquement différents, à savoir:

L. icterohaemorrhagiae Verdun, *L. canicola C* 7, *L. sejroe*, *L. grippotyphosa Schlesien*, *L. biflexa* Patoc (souches envoyées par le Prof. Jerovec de Prague (1950) et *L. pomona* 396 (isolée à Bucarest en 1950).

Comme pour la plupart des cas on n'avait pas essayé d'isoler les leptospires, nous avons choisi pour la détermination du type sérologique, le titre maximum obtenu par les dernières réactions d'agglutination-lyse, exécutées pour chaque cas séparément. Nous avons considéré comme cas à type non-déterminable, ceux qui ont présenté jusqu'au dernier examen un titre égal pour deux sérotypes différents, ainsi que les cas où existaient des agglutinines exclusivement pour le type *L. biflexa* Patoc.

RÉSULTATS

Les 261 cas étudiés, sont dus selon les données sérologiques, aux types de leptospires suivants:

205 cas de *L. pomona*
24 cas de *L. canicola*
17 cas de *L. icterohaemorrhagiae*
8 cas de *L. sejroe*
7 cas de type non-déterminé

Moment de l'apparition des agglutinines. Sur un total de 56 épreuves sériques exécutées entre le 3-e et le 7-e jour après le début de la maladie (première semaine) seulement 26 ont donné des réactions d'agglutination-lyse positives (46,4%). Si nous considérons les épreuves entre le 3-e et le 5-e jour, le pourcentage des réactions positives baisse à 6,25% et pour celles examinées entre le 6-e et le 7-e jour augmente à 64,1% (graphique No. 1).

Les titres agglutinants varient entre 1/100 (2 sérums) et 1/12.800 (1 sérum), la majorité des sérums positifs ayant des titres de 1/400 à 1/3.200.

Dans la seconde semaine (8 à 14 jours), sur 284 sérums examinés, 273 ont donné des réactions positives (96,1%). Défalquant les sérums examinés entre le 8-e et le 11-e jour, le taux des réactions positives est de 92,76% et augmente à 99,2% pour les sérums obtenus entre le 12-e et le 14-e jour de maladie. Les titres agglutinants varient entre 1/100 (6 sérums) et 1/405.600 (1 sérum). La majorité des sérums positifs ont des titres de 1/800 à 1/12.800.

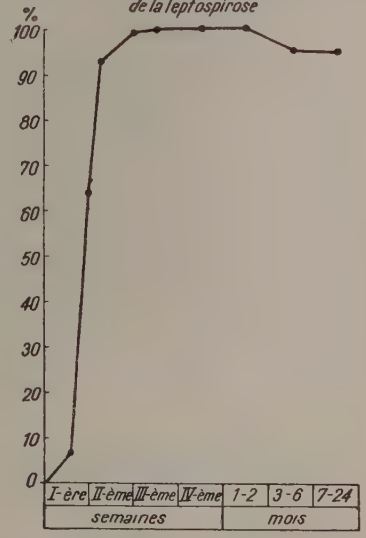
Pendant la troisième semaine (15 à 21 jours) le pourcentage des réactions positives atteint 100% (152 sérums examinés) et se maintient ainsi jusqu'au second mois. Les titres agglutinants varient entre 1/400 (6 sérums) et 1/102.400 (3 sérums), avec prédominance des titres de 1/800 à 1/12.800.

Au cours de la quatrième semaine, les titres agglutinants varient entre 1/400 (1 sérum) et 1/51.200 (2 sérums), la plupart se situant entre 1/800 et 1/12.800. Le second mois les titres agglutinants varient entre 1/400 (5 sérums) et 1/102.400 (1 sérum), la majorité entre 1/800 à 1/6.400. A partir du 3-e mois jusqu'à 2 ans, les titres varient entre 1/100 (12 sérums) et 1/25.600 (1 sérum), avec prédominance des sérums de 1/100 à 1/3.200; 6,2% des sérums examinés, provenant de cas antérieurement positifs, sont devenus négatifs (4 cas de *L. sejroe*, 3 de *L. pomona* et 1 cas non déterminé).

Coagglutinines et possibilités de détermination du type sérologique.

a) *Première semaine à partir du début de la maladie.* Sur 26 épreuves positives, six (23,7%) ont présenté des réactions paradoxales. La plupart de ces réactions étaient dues aux coagglutinines *L. biflexa* Patoc. En faisant abstraction de ces dernières coagglutinines, le pourcentage des réactions paradoxales se réduit à 7,6%. Parmi les 22 sérums (sur 26 sérums positifs) avec agglutinines pour *L. pomona*, 14 possédaient des coagglutinines (63,3%), dont 10 pour *L. biflexa* Patoc seul, 3 pour *L. biflexa* Patoc et *L. icterohaemorrhagiae*, et un sérum avec coagglutinines pour *L. canicola* et *L. bejroe*.

Graphique nr.1
Evolution des anticorps agglutinants à différents intervalles depuis le début de la leptospirose



Durant cette première semaine, les coagglutinines pour *L. biflexa* sont apparues dans 57,6% de la totalité des sérums positifs. (graphiques Nos. 2 et 3).

Pour des raisons que l'on verra plus loin, nous considérons les agglutinines anti-biflexa Patoc comme non-spécifiques de type. On peut faire abstraction de ces agglutinines, ce qui nous permet de déterminer le type de leptospire, dans 92,3% des cas, dès la première semaine, lorsque la RAL est positive.

b) *Seconde semaine.* Sur 273 épreuves positives, enregistrées entre le 8-e et le 14-e jour de maladie, 72 présentent des réactions paradoxales (26,37%) — 53 étant dues aux coagglutinines *L. biflexa* Patoc. Il reste par conséquent, seulement 19 (6,9%) réactions paradoxales si l'on ne considère pas les résultats obtenus avec *L. biflexa* Patoc. Mais comme 6 sérums n'agglutinent que *L. biflexa* Patoc, le nombre des résultats négatifs augmente, en réduisant le pourcentage de positivité sérique de la seconde semaine de 96,1 à 94 (dans 2,1% des cas le diagnostic reste négatif).

Les coagglutinines apparaissent dans 80,5% des sérums et les coagglutinines anti-biflexa Patoc dans 62,1% des sérums. En ignorant les coagglutinines pour *L. biflexa* Patoc, la RAL peut être considérée spécifique dans 92,8% des cas.

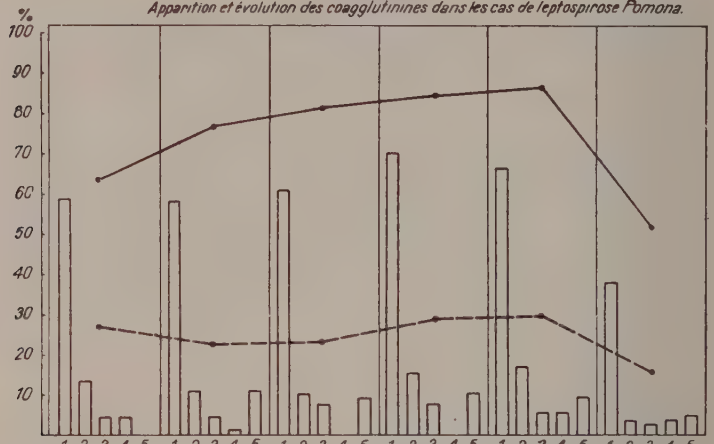
c) *Troisième semaine.* Entre le 14-e et le 21-e jour, toutes les 152 épreuves sériques ont donné des résultats positifs. Le nombre des réactions paradoxales tombe de 24 (15,7%) à 3 (2%) si on fait abstraction des coagglutinines anti-biflexa Patoc, mais deux sérums avec agglutinines exclusivement pour *L. biflexa* Patoc deviennent négatifs, ce qui réduit par conséquent, le pourcentage de positivité à 98,6%. Indifféremment du type, les coagglutinines sont apparues dans 84,2% des épreuves et les coagglutinines anti-biflexa Patoc dans 65% du total des sérums.

Sans compter les résultats obtenus avec le *L. biflexa* Patoc au cours de la troisième semaine, on peut déterminer le sérotype dans 98% des cas.

d) *Quatrième semaine.* Les 52 sérums examinés donnent tous une RAL positive, avec 10 réactions paradoxales (19,4%). Sans le *L. biflexa* Patoc, il reste

Graphique nr.2

Apparition et évolution des coagglutinines dans les cas de leptospirose Pomona.



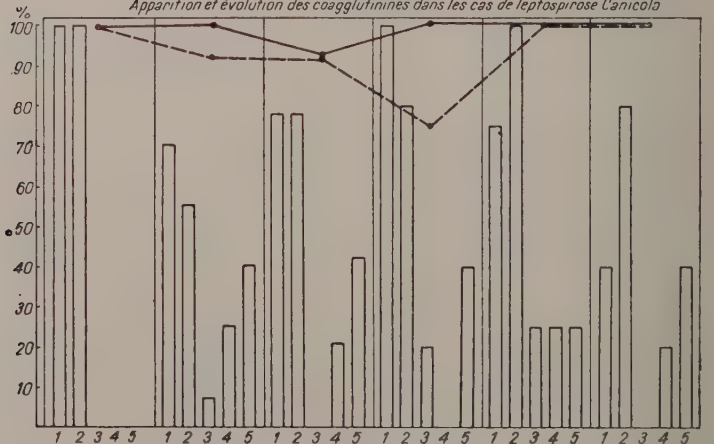
——Evolution procentuelle des coagglutinines

— — " " " " ,exclusivement pour L.biflexa Patoc.

1. Coagglutinines pour L. biflexa Patoc
2. " " L. icterohaemorrhagiae
3. " " L. canicola
4. " " L.sejroe
5. " " L.grippo-typhosa

Graphique nr.3

Apparition et évolution des coagglutinines dans les cas de leptospirose Canicola



——Evolution procentuelle des coagglutinines

— — " " " " ,exclusivement pour L biflexa Patoc

1. Coagglutinines pour L biflexa Patoc
2. " " L icterohaemorrhagiae
3. " " L.sejroe
4. " " L.grippo-typhosa
5. " " L.pomona

eulement deux réactions paradoxales (4%), mais deux épreuves deviennent ıégatives.

Les coagglutinines apparaissent dans 86,5% du total des essais, dont 75% ›our *L. biflexa* Patoc. Si nous omettons ces dernières coagglutinines, nous pouvons léterminer le sérotype dans 96% des cas, en perdant cependant 3,8% des sérums ›ositifs.

e) *Second mois.* La positivité est de 100% (61 sérums) avec 11 réactions ›aradoxales (18%) et seulement 4 (6,6%) si nous ignorons les coagglutinines *L. biflexa* Patoc, quand réapparaît un sérum négatif. Il s'agit d'un cas sérologiquement indéterminé, avec agglutinines seulement pour *L. biflexa* Patoc (3 :xamens successifs jusqu'au 33-e jour), dont nous avons isolé à partir de l'urine, ıne souche de *L. pomona.* Ce cas, ainsi que 2 autres qui, à l'examen sérologique ınique, possédaient des agglutinines exclusivement pour *L. biflexa* Patoc et lont nous avons obtenu par cultures des souches de *L. pomona*, nous font considérer l'agglutination de *L. biflexa* Patoc comme significative pour l'infection ı leptospires, bien que non-spécifique de type.

Dans 88,5% des sérums examinés au cours du second mois, apparaissent les coagglutinines, dont 67,2% sont des coagglutinines pour *L. biflexa* Patoc. En omettant les coagglutinines antibiflexa Patoc, le diagnostic de type peut être établi dans 93,3% des cas.

f) *Du troisième au sixième mois.* Sur 70 sérums examinés, 67 présentent les résultats positifs (95,7%). Deux cas à *L. pomona* et un à *L. sejroe* sont devenus sérologiquement négatifs après le 3-e mois. Les réactions paradoxales ›ont apparues dans 7 des examens pratiqués (10%). Si l'on exclut les coagglu- inines pour *L. biflexa* Patoc, les réactions paradoxales se réduisent à 1,4% et a positivité descend à 94,2% à cause d'un sérum provenant d'un autre cas à *L. pomona* devenu négatif.

Les coagglutinines apparaissent dans 45,7% des épreuves, et celles pour *L. biflexa* Patoc dans 31,4%; le diagnostic de type pouvant être établi dans 98,6% des examens.

g) *Du 7-e au 12-e mois.* Sur 43 examens sérologiques, 40 ont donné des résultats positifs (95,7%). Les sérums de deux autres malades à *L. sejroe* et à ype non-déterminé, perdent les agglutinines après 7 mois du début de la maladie.

Sept essais ont donné des réactions paradoxales (17,5%) dont 3 (7,6%) seulement si l'on élimine les coagglutinines pour *L. biflexa* Patoc. Ainsi, le type peut être déterminé dans 92,3 % des cas.

Les coagglutinines, en général, sont présentes dans 70% des épreuves, tandis que pour le *L. biflexa* Patoc elles le sont dans 50% des épreuves.

h) *De 1 à 2 ans du début.* Dans cet espace de temps, seulement 4 cas ›nt été examinés (infections à *L. pomona)*, tous à RAL positives. Dans deux épreuves les titres agglutinants pour *L. biflexa* Patoc et *L. pomona* étaient identiques.

DISCUSSION

En ce qui concerne le moment de l'apparition des anticorps, VARFOLOMEEVA (7) observe dans la première semaine les titres agglutinants suivants: le 5-e jour 1/10; le 6-e 1/10—1/50; le 7-e 1/100. Les sérums contrôlés par nous auraient probablement donné un taux de positivité plus élevé si pour la RAL on avait employé dans nos recherches des dilutions inférieures à 1/100. Il ressort de nos résultats, qu'en moyenne 50% des sérums réagissent positivement à

partir de la première semaine de maladie. Il est certain que les variations dépendent de la réactivité individuelle. Le contrôle sérologique dans cette phase est précieux, même dans les cas négatifs, par le fait que les examens ultérieurs positifs sont un indicateur certain de leptospirose.

Quant à la persistance des anticorps, des variations individuelles ont été également signalées, indifféremment du type étiologique. Tarasov (6) cite la persistance pendant deux années des agglutinines chez les individus ayant souffert de leptospirose à L. grippotyphosa. Il résulte de notre statistique que 10% des anciens malades perdent les agglutinines à partir du 3-e mois jusqu'à un an.

Des oscillations inattendues quant au titre agglutinant, de même que les réactions devenues négatives, avec réapparition des agglutinines ou coagglutinines aux examens ultérieurs ont été observées dans 5 cas. L'explication est difficile à donner, attendu qu'en dehors de certains états physio-pathologiques spéciaux possibles, l'inégalité de la sensibilité des souches de leptospires avec lesquelles les réactions ont été effectuées, joue certainement un rôle. Borg Petersen (2) a montré que l'agglutinabilité d'une culture est en fonction non seulement de la densité (inversement proportionnelle à la densité), mais aussi de la « sensibilité » de la souche. Au cours de nos recherches, nous avons utilisé des souches de densité approximativement égale et contrôlées quant à l'agglutinabilité avec les sérums homologues — sans aller à vrai dire jusqu'au titre du sérum, ce qui nous aurait donné une idée plus exacte de la sensibilité de la souche. Nos recherches ont prouvé que certains sérotypes *(L. biflexa* Patoc, *L. sejroe*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. canicola)* présentent des phases où ils sont plus facilement agglutinables et que le même sérum contrôlé à des intervalles variables peut marquer des différences de titre, lesquelles, à part les motifs d'erreurs possibles (pipettes inégalement calibrées) ne peuvent être attribuées qu'à la sensibilite de la souche. Ces différences pourraient être corrigées soit par l'exécution de la RAL avec tous les échantillons de sérums (récoltés successivement du même patient) le même jour et avec les mêmes souches, soit par l'appréciation de la sensibilité de la souche vis-à-vis du sérum homologue, allant jusqu'au titre du sérum.

Il ressort de notre statistique que l'on peut établir le type de leptospirose à l'aide de la RAL pour plus de 90% des sérums positifs. Dans nos recherches nous avons utilisé seulement 6 types sérologiquement différents. Le pourcentage des réactions paradoxales augmente à mesure que l'on introduit dans la RAL un nombre plus élevé de sérotypes différents.

D'autres auteurs ont également constaté un pourcentage de cas où le sérotype ne peut être déterminé par la RAL. Alexander et coll. (1) contrôlant 93 sérums de malades avec leptospirose, trouvent dans 10,8% des cas une discordance entre la RAL et le type isolé. Zaharija (8) considère également douteuse la détermination du sérotype par la RAL.

Il va sans dire que l'isolement du leptospire est le moyen le plus sûr pour établir le type. Il est certain que la présence d'une infection mixte avec isolement seulement d'un des types pourrait constituer des difficultés, mais ces cas sont rares.

La sensibilité du type L. *biflexa* Patoc vis-à-vis des sérums des malades de leptospirose ressort nettement de nos recherches. Indépendamment du type causal, nous avons trouvé dans plus de 60% des cas, des coagglutinines pour le type *L. biflexa* Patoc, qui parfois était le seul agglutiné, bien que le malade était porteur d'un autre sérotype. Ceci plaide en faveur de l'emploi du *L. biflexa*

Patoc dans la RAL, afin de détecter certains cas qui passeraient autrement inaperçus. KMETY (4) remarque également l'existence des coagglutinines pour *L. biflexa* Patoc ainsi que la précocité des réactions paradoxales.

Le fait que nous avons isolé un leptospire d'un autre type sérologique dans un cas à coagglutinines pour *L. biflexa* Patoc et la constatation que les coagglutinines pour ce type apparaissent fréquemment, nous amène à entrevoir la nécessité d'une étude antigénique des leptospires saprophytes et le contrôle de leur comportement sérologique dans les leptospiroses de l'homme et des animaux.

RÉSUMÉ

On a contrôlé, par la réaction d'agglutination-lyse (RAL) répétée, 261 cas de leptospirose dans le but d'apprécier le moment de l'apparition des anticorps ainsi que la valeur de cette réaction pour la détermination du type étiologique de leptospire.

Selon le titre agglutinant maximum donné par les dernières réactions d'agglutination-lyse, les 261 cas de leptospiroses étaient dus aux types suivants:

205 cas à *L. pomona*,
24 cas à *L. canicola*,
17 cas à *L. icterohaemorrhagiae*,
8 cas à *L. sejroe*,
7 cas à types non-déterminés.

Les anticorps agglutinants apparaissent dans 6,2% des sérums examinés entre le 3-e et 5-e jour du début de la maladie; dans 64,10% de ceux examinés entre le 6-e et 7-e jour; 92,7% entre le 8-e et 11-e jour; 99,2% entre le 12-e et 14-e jour et 100% au cours de la troisième semaine. Ces chiffres diminuent si on fait abstraction des réactions paradoxales dues aux agglutinines non-spécifiques anti-*L. biflexa* Patoc.

Dix pour 100 des cas perdent les agglutinines après 3 à 7 mois de la maladie (3 sur 4 cas de leptospirose sejroe, 3 sur 64 de leptospirose L. pomona et un cas non-déterminé contrôlés dans cet intervalle).

Le diagnostic du type de leptospire qui a provoqué l'affection, peut être apprécié dans plus de 90% des épreuves sérologiques au cours de n'importe laquelle des premières quatre semaines. La souche *L. biflexa* Patoc fréquemment agglutinée par les sérums des malades, augmente considérablement le nombre des réactions paradoxales. Ce type est agglutiné par 59-85% des sérums des malades et parfois réagit plus tôt que les autres sérotypes ou même exclusivement, permettant de diagnostiquer des cas qui passeraient comme étant sérologiquement négatifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER A. D., EVANS L. B. et coll. — Am. J. Trop. Med. and Hyg. 1957, **6**, 871.
2. BORG PETERSEN et FAGRAEUS A. — Acta Pathol. et Microbiol. Scand., 1949, **26**, 555.
3. COMBIESCO D., ANGELESCO I. et BOTEZ V. — Studii şi Cercet. de Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., Acad. RPR, 1953, **4**, 483.
4. KMETY E. — Zblt. f. Bakt., Orig., 1957, **170**, 597.
5. MARCUSE K. et POHLMANN R. — Zblt. f. Bakt. I. Orig., 1951, **157**, 490.
6. TARASOV S. — Bull. Inst. Pasteur, 1932, **30**, 570.
7. VARFOLOMEEVA A. A. — Leptospiroses humaines, Moscou, Medghiz, 1947.
8. ZAHARIJA I. — Zt. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten, 1957, **144**, 172.

ДИНАМИКА АГГЛЮТИНИНОВ ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗЕ ЛЮДЕЙ ЗНАЧЕНИЕ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ-ЛИЗИСА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПА.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

При помощи повторных серологических исследований (реакция агглютинации — лизиса) велись наблюдения над 261 больным лептопирозом, в целях установления срока появления антител и оценки значения данной реакции для определения типа лептоспиры, вызвавшей одно или другое заболевание.

Судя по максимальному агглютинирующему титру, полученному в последних реакциях агглютинации — лизиса, вышеупомянутые 261 заболевание было вызвано следующими типами лептоспир:

205 заболеваний *лептоспирозом pomona*
24 заболеваний *лептоспирозом canicola*
17 заболеваний *иктерогеморрагическим лептоспирозом*
8 заболеваний лептоспирозом *sejroe*
7 заболеваний лептоспирозом неопределенного типа.

Агглютинирующие антитела появляются между 3-им и 5-ым днем заболевания, в 6,2% обследованных сывороток; между 6-ым и 7-ым днем в 64, 10%; между 8-ым и 11-ым днем в 92,7%; между 12—14-ым днем в 99,2% и в 100% образцов сыворотки взятых в течении III-ей недели с начала заболевания. Вышеуказанные цифры снижаются в некоторой степени при отсутствии парадоксальных реакций неспецифических агглютининов по отношению к L. biflexa Patoc

В 10% случаев реакция агглютинации -лизиса становится отрицательной между 3-им и 7-ым месяцем от появления заболевания (3 из 4 заболеваний лептоспирозом Sejroe 3 из 64 заболеваний лепт оспирозом pomona и одно заболевание неопределенного типа).

Определение типа лептоспиры, вызвавшей заболевание возможно в свыше 90% серологических образцов, в течение первых 4-ех недель от начала заболевания. Применение L. biflexa Patoc часто агглютинируемой сыворотками лептоспирозных больных, независимо от типа заболевания, значительно повышает количество парадоксальных реакций. Данный тип лептоспир аглютинируется в 59—85% сыворотками лептоспирозных больных, иногда раньше или исключительно, способствуя выявлению заболеваний, которые можно было бы принять за серологически отрицательные.

DER VERLAUF DER AGGLUTININBILDUNG BEI MENSCHLICHEN LEPTOSPIROSEN. DER WERT DER AGGLUTINATIONS-LYSEREAKTION FÜR DIE TYPENBESTIMMUNG.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch wiederholte serologische Prüfung (Agglutinations-Lysereaktion) wurden 261 Leptospirosepatienten mit der Absicht untersucht, den Augenblick des Auftretens der Antikörper festzustellen und den Wert der Reaktion für die Bestimmung des Leptospirentypus, der die Krankheit hervorgerufen hatte abzuschätzen.

Auf Grund des höchsten Agglutinintiters, der bei den letzten A.L.R-en festgestellt wurde, waren die 261 Fälle folgenden Leptospirentypen zuzuschreiben:

205 Fälle durch *Leptospira pomona*
24 Fälle durch *Leptospira canicola*
17 Fälle durch *Leptospira icterohaemorrhagiae*
8 Fälle durch *Leptospira sejroe*
7 Fälle durch unbestimmte Leptospiren

In 6,2% der untersuchten Sera erschienen die agglutinierenden Antikörper am 3-ten — 4-ten Tag, nach Beginn der Krankheit; in 64,10% am 6-ten — 7-ten, in 92,7% am 8-ten — 11-ten, in 99,2% am 12-ten — 14-ten und in 100% der Proben von der dritten Woche nach Krankheitsbeginn an. Die Prozentsätze sind etwas niedriger, wenn paradoxe Reaktionen durch unspezifische Coagglutinine gegen *L. biflexa* Patoc nicht in Betracht gezogen werden.

Bei etwa 10% der Fälle wird die A.L.R. nach dem 3—ten und 7-ten Monat nach Krankheitsbeginn negativ (3 von 4 Fällen von Leptospirosis durch *L. sejroe*, 3 von 64 Fällen von Leptospirosis durch *L. pomona* und ein unbestimmter Fall, die nach Ablauf dieser Zeitspanne untersucht wurden).

Der Leptospirentypus, der die Erkrankung hervorgerufen hat, kann in jeder der ersten ier Wochen nach Krankheitsbeginn, in über 90% der serologischen Proben bestimmt werden.)ie Anzahl paradoxer Reaktionen steigt erheblich infolge der oftmals eintretenden Agglutina- on des Stammes *L. biflexa* Patoc durch Sera von Leptospirosepatienten, unabhängig davon :elcher Typus die Erkrankung hervorgerufen hat. Dieser Leptospirentypus wird von 59— 5% der Sera von Leptospirosekranken agglutiniert und ist mitunter der erste oder einzige er reagiert, wodurch Fälle aufgedeckt werden, die als serologisch negativ gegolten hätten.

'HE COURSE OF AGGLUTININ FORMATION IN HUMAN LEPTOSPIROSIS. THE VALUE OF THE AGGLUTINATION-LYSIS REACTION FOR TYPE DETERMINATIONS

SUMMARY

A number of 261 patients suffering from leptospirosis were subjected to repeated sero-)gical testing (agglutination-lysis reaction) with a view to determining the moment when ntibodies appeared in the blood serum and estimating the value of the reaction as a means f detecting the leptospira type which had caused the disease.

According to the maximum agglutinating titre recorded in the last agglutination-lysis :eaction, the 261 cases were caused by the following types of leptospirae:

205 cases by *Leptospira pomona*
24 cases by *Leptospira canicola*
17 cases by *Leptospira icterohaemorrhagiae*
8 cases by *Leptospira sejroe*
7 cases by undetermined types

Agglutinating antibodies are present in 6,2% of the sera tested 3—5 days after the onset f the disease; in 64,1% of those tested on the 6th-7th day; in 92,7% on the 8th-11th day; 1 92,2% on the 12th — 14th day; and in 100% of the cases during the 3rd week of ie disease. Slightly lower percentage rates are obtained if paradoxical reactions due to non-)ecific co-agglutinins versus *L. biflexa* Patoc are not taken into account.

In about 10% of the cases A.L.Rs. become negative 3 and 7 months after the onset of ie disease (3 out of 4 cases due to *L. sejroe*, 3 out of 64 cases due to *L. pomona*, and one ndetermined case, all of which were tested after the above intervals).

The type of leptospira responsible for the disease may be determined in over 90% of ie serological specimens, during any of the first 4 weeks following the onset. The number f paradoxical reactions is considerably increased owing to the frequently occurring agglutina- on of the strain *L. biflexa* Patoc by the sera of patients suffering of leptospirosis, irrespec- ve of the type which has caused the disease. This particular type is agglutinated by 59—85% f the sera of patients suffering from leptospirosis, and may sometimes be the first or the only ie to react. Thus, cases may be detected which would otherwise be considered as serological- negative.

PURIFICATION PARTIELLE DE L'ANATOXINE ET DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE ALPHA

par

LYDIA MESROBEANU, ECATERINA ALEXENCO et NATALIA MITRICĂ

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie Microbienne et Service des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 12 janvier 1960 —

La purification des toxines et des anatoxines à l'aide de leur précipitation au point iso-électrique, par addition d'acides faibles (acide acétique) ou forts, (acide chlorhydrique), a fait l'objet de nombreuses recherches (1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 16, 21, 23). La technique décrite par BOIVIN et ses collaborateurs est l'une des plus utilisées. Elle consiste dans la précipitation des exotoxines par addition aux filtrats de culture d'acide trichloracétique, jusqu'à l'obtention d'un pH de 3,5 et redissolution du précipité formé dans une solution faiblement alcaline. BOIVIN a appliqué avec succès cette méthode en 1936 pour la purification partielle d'une anatoxine provenant de cultures de staphylocoques en milieu liquide.

La toxine staphylococcique est préparée à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », à partir de cultures en atmosphère de CO_2 (20—30%) de la souche Wood 46, sur milieu Hottinger (13) gélosé 7‰, modifié par COMBIESCO et coll. (7). Ce milieu a la composition suivante:

200 ml digestion tryptique de viande de veau (Hottinger)
800 ml macération de viande de veau
1 gr PO_4Na_2H,
1 gr glucose
1 gr PO_4H_2K,
1 gr maltose
0,3 gr $Mg\ SO_4$
gélose 7‰
pH final = 7,4

Les toxines obtenues sur ce milieu ont des titres compris entre 1000—8000 DMH ml; 0,002 DMM/ml et généralement 30—50 Lf/ml. Les anatoxines sont préparées par addition de formol 4‰ et incubation à 37°, pendant 2—4 semaines.

La technique de BOIVIN et collaborateurs appliquée à la purification de l'anatoxine staphylococcique, obtenue dans ces conditions, s'est montrée moins efficace, surtout lorsqu'il s'agissait de produits à titre floculant faible (10—15 Lf/ml).

Dans un mémoire, paru en 1952, nous avons exposé les résultats des recherches faites en collaboration avec COMBIESCO et coll. (6), au cours desquelles nous avons utilisé comme agents précipitants de l'anatoxine staphylococcique, le $SO_4(NH_4)_2$, (12), l'acide trichloracétique et l'action combinée de l'acide trichlora-

cétique et de l'alcool à 96°. Cette dernière méthode est employée depuis à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » pour la préparation courante de l'anatoxine staphylococcique purifiée.

Nos recherches, effectuées sur l'anatoxine brute, ont montré que le produit obtenu par précipitation avec l'acide trichloracétique était plus pur et mieux toléré par l'organisme humain, que celui obtenu par précipitation avec du sulfate d'ammonium. L'emploi de l'acide trichloracétique comme agent précipitant présente cependant une série d'inconvénients, dont le plus important est celui de la précipitation incomplète de l'anatoxine, surtout avec les produits à faible pouvoir floculant. En prolongeant la durée de l'action de l'acide sur l'anatoxine ou en baissant le pH sous 3,5, on obtient des produits dont les Kf augmentent jusqu'à 30 à 40 heures et qui sont impurifiés par des substances azotées, non spécifiques, provenant du milieu de culture.

De plus, lorsqu'on emploie l'acide trichloracétique comme seul agent précipitant, le rendement ne dépasse pas 60%, même pour les anatoxines brutes, dont le titre floculant est de 20—45 Lf/ml. D'ANTONA (9) a publié récemment des observations comparables aux nôtres, en ce qui concerne la purification des anatoxines staphylococciques par les acides.

À la suite de ces constatations, nous nous sommes proposés d'établir une méthode de purification simple et rapide, qui permette:

1. de concentrer les anatoxines à faible titre floculant;
2. de purifier ces anatoxines en réduisant leur contenu en azote par Lf;
3. d'obtenir des rendements supérieurs à 60%;
4. de conserver aux produits purifiés la vitesse de floculation de l'anatoxine brute, indice que leurs qualités physico-chimiques ne s'étaient pas altérées au cours du processus de purification;
5. d'obtenir des produits avec une valeur immunologique évidente, et qui, injectés à l'homme, ne donnent pas de réactions locales ou générales.

Après de nombreux essais, nous nous sommes fixés au procédé suivant:

Le pH des anatoxines brutes, maintenues préalablement à + 4°, est ramené à 3,5 par addition d'acide trichloracétique, ajoutant immédiatement après, deux volumes d'alcool à 96° (+ 4°). Après agitation, le précipité, apparu instantanément ou très rapidement, est séparé par centrifugation de 20 minutes à 3000 t/m.

Après sédimentation, le liquide surnageant est décanté; le précipité d'anatoxine essoré, suspendu dans un minimum de solution de CO_3Na_2 N/100 est trituré avec une baguette de verre, ou agité dans un ballon avec des perles de verre; finalement, on ajoute à la solution, en cas de dissolution incomplète du précipité, quelques gouttes de NaOH à 20%.

Tenant compte du Lf/ml de l'anatoxine brute, on dilue la solution avec la quantité nécessaire de sérum physiologique ou d'eau distillée, pour obtenir le volume final de 1/5 ou 1/10 du volume initial. Après filtration sur Seitz EK, le produit est titré et fiolé, en concentration voulue.

Le tableau I présente les caractéristiques comparatives du produit obtenu avec la méthode décrite et des produits obtenus par les méthodes utilisées antérieurement.

Tableau I

	Lf. par mg. N	Kf, en heures	Rds. %
natoxine brute 20 Lf/ml	5.25	4	—
natoxine purifiée par SO_4 $(NH_4)_2$ à sat	36	1	70
natoxine purifiée par l'acide trichloracétique	880	36	54
natoxine purifiée par *la méthode acide + alcool*	880	2	92

En comparant les Lf par mg N des anatoxines purifiées par les trois méthodes tilisées, on constate que l'anatoxine précipitée par le $SO_4(NH_4)_2$ ne possède ue 36 Lf/mg N, alors que les deux autres ont un titre considérablement plus levé (880 Lf/mg N). Elles diffèrent pourtant par leur vitesse de floculation; 'anatoxine purifiée à l'aide de l'acide trichloracétique seul, présente un temps de loculation environ 18 fois plus élevé que celui du produit purifié par la méthode cide + alcool. Après purification à l'aide de la méthode préconisée par nous, e produit a floculé deux fois plus vite que l'anatoxine brute.

La précipitation par acide-alcool (96°) présente en plus l'avantage d'un endement de beaucoup supérieur (92%) à celui des deux autres méthodes 70% et 54%).

L'anatoxine obtenue par précipitation combinée acide + alcool, inoculée l'homme, en doses progressives (6 injections, totalisant 100 Lf) n'a donné aucune éaction locale ou générale. Le titre en U.A. du sérum des sujets normaux, ou e sujets présentant diverses affections staphylococciques, a varié entre 4 — 40 .A./ml.

L'examen électrophorétique (appareil de Kern, pH 8,6, force ionique 0,05) e l'anatoxine staphylococcique purifiée par le procédé « acide-alcool », en comaraison avec celui de l'anatoxine brute, a montré les faits suivants:

L'anatoxine brute contient trois fractions: la première de 46,25%, la deuxième e 27,5% et la troisième de 26,25%, tandis que l'anatoxine purifiée ne contient ue deux fractions. Une des fractions du produit partiellement purifié corresond — comme vitesse de migration — à la première fraction du produit brut t représente 58,1%, alors que l'autre, correspondant à la troisième fraction du roduit brut, représente 41,9% de la totalité du produit purifié.

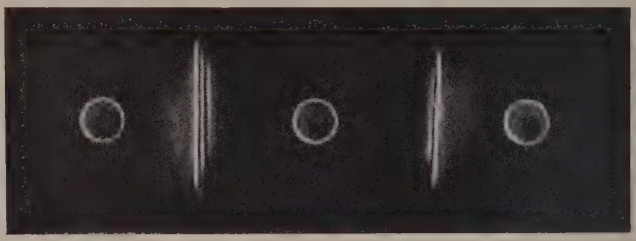
L'électrophorèse en gel d'agar (15, 22) et sur papier filtre (10, 14) a montré ue la première fraction possède une vitesse de migration comparable à celle es alpha-globulines sériques.

L'immuno-électrophorèse a été pratiquée avec des sérums humains et e lapin anti-anatoxine brute et anti-anatoxine purifiée et avec un sérum de cheval nti-anatoxine brute. (11).

Les sérums antitoxiques humains provenaient de deux sujets, l'un inoculé vec une anatoxine brute, contenant 20 Lf/ml, l'autre avec une anatoxine purié ayant le même titre. Les sujets ont reçu, à 3 jours d'intervalle, 6 injections, otalisant 4,5 ml = 90 Lf, (0,25 ml; 0,5 ml; 0,75 ml; 1 ml; 1 ml; 1 ml) Les sérums btenus, dont le titre antitoxique était de 20 U.A. ont été utilisés dans les expéences d'immuno-électrophorèse et de diffusion en gel d'agar.

Les expériences de diffusion d'après OUCHTERLONY ont été effectuées ur des plaques de verre, recouvertes d'une couche d'agar (17), le sérum à essayer

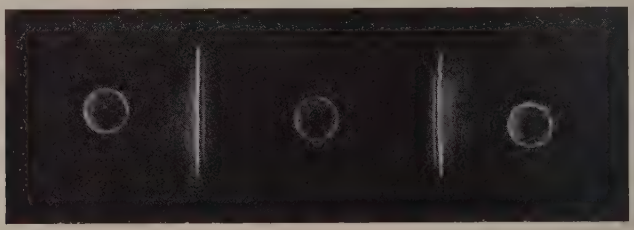
étant introduit dans un réservoir central et les deux anatoxines (brute et partiellement purifiée) dans des réservoirs latéraux. Après 5 jours de conservation en chambre humide, on notait les lignes de précipitation apparues.



Anatoxine brute | Sérum Antianatox. brute | Anatoxine purifiée

Fig. 1

Le sérum humain anti-anatoxine brute (Fig. 1) donnait trois lignes de précipitation avec l'anatoxine brute et deux avec l'anatoxine purifiée; le sérum humain anti-anatoxine purifiée (Fig. 2) ne donnait que deux lignes de précipitation avec les deux antitoxines.



Anatoxine brute | Sérum Antianatox. purifiée | Anatoxine purifiée

Fig. 2

Ces résultats concordent avec ceux fournis par l'électrophorèse libre.

Les analyses montrent que la purification par la méthode «acide-alcool» élimine une fraction antigénique non-spécifique, sa disparition n'affectant pas les qualités immunologiques de l'anatoxine.

Les essais effectués avec le sérum de lapin anti-anatoxine brute et anti-anatoxine purifiée ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec les sérums antitoxiques humains.

Le sérum de cheval anti-anatoxine brute donne 4 lignes de précipitation avec l'anatoxine brute et 3 avec l'anatoxine purifiée. Donc, le sérum de cheval se comporte différemment des sérums anti-anatoxine brute, préparés sur lapins et sur l'homme.

Pour les recherches d'immunoélectrophorèse, nous avons utilisé des érums humains anti-anatoxine brute et purifiée et un sérum de cheval anti- natoxine brute.

Dans une première série d'expériences, après séparation par électrophorèse, les composantes protéiques des sérums antitoxiques humains sur gel d'agar, on

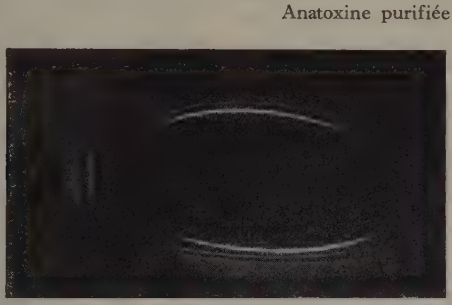


Fig. 3

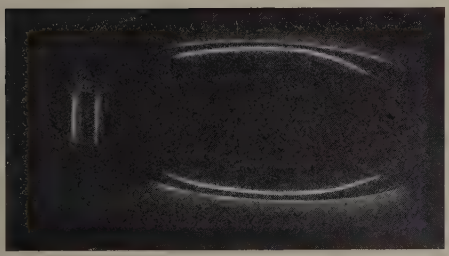


Fig. 4

appliqué une bande de papier filtre, imbibée avec l'anatoxine brute au haut e la lame et une deuxième, imbibée d'anatoxine purifiée, au bas de la lame. près 8 jours de conservation en chambre humide, les bandes de papier ltre étaient enlevées et les lames traitées selon les indications d'URIEL et GRABAR. (22).

Les résultats obtenus avec le sérum humain anti-anatoxine brute exposés ans la Fig. 3, montrent que dans la région des gamma-globulines les anticorps nti-anatoxines staphylococciques des sérums humains donnent, avec les ana- oxines brutes, trois lignes de précipitation, alors qu'avec les anatoxines urifiées ils n'en donnent que deux.

Des résultats de l'immuno-électrophorèse, pratiquée avec le sérum humain nti-anatoxine staphylococcique purifiée, exposés dans la Fig. 4, il ressort que ans la région des gamma-globulines apparaissent, tant avec l'anatoxine brute u'avec celle purifiée, seulement deux lignes de précipitation.

Ces expériences confirment nos observations antérieures, ayant montré que l'anatoxine brute contient trois fractions antigéniques, alors que l'anatoxine purifiée n'en contient que deux.

Les expériences d'immuno-électrophorèse faites avec le sérum de cheval, anti-anatoxine staphylococcique brute, ont donné des résultats similaires à ceux obtenus par REYNAUD et coll. (19) dans les recherches effectuées avec les sérums anti-toxines diphtérique et tétanique. Ces auteurs avaient également constaté que les anticorps antitoxiques étaient localisés dans les régions des gamma et des bêta-globulines. Nous signalons, en plus, l'existence de trois lignes de précipitation dans la région des gamma-globulines et de deux lignes seulement dans la région des bêta-globulines.

*

La technique de purification partielle de l'anatoxine staphylococcique alpha, décrite ci-dessus (6), a été également appliquée à la purification de la toxine, préparée sur le même milieu de culture.

Le filtrat toxique, ainsi que l'acide trichloracétique et l'alcool utilisés dans le processus de purification, sont préalablement maintenus à + 4°C. Pour obtenir un rendement élevé, il est indispensable que toutes les opérations soient effectuées à froid. Le mélange toxine + alcool, ajusté à pH 3,5 avec l'acide trichloracétique est maintenu pendant 20 minutes à + 4°C, en agitant vigoureusement. Le précipité de toxine apparaît moins vite que celui de l'anatoxine. Après centrifugation de 30 minutes à 3000 t/m, le précipité essoré est repris dans du tampon phosphate pH = 8, la dissolution étant achevée par l'addition de quelques gouttes d'une solution NaOH 20%. Comme dans le cas de l'anatoxine, on ajoute ensuite la quantité nécessaire de solution physiologique de NaCl, afin de réaliser 1/5 du volume initial. La solution de toxine obtenue après filtration sur Seitz EK a été étudiée en comparaison avec la toxine brute, du point de vue propriétés biologiques et chimiques.

Dans le tableau II sont exposés les principales caractéristiques de la toxine purifiée et de la toxine brute, les valeurs étant rapportées à 1 mg N.

Tableau II

	Lf/mg N	Kf minutes	DMH/mg N	DMN/mg N	Rd. %
Toxine brute	9,5	20	290	475	—
Toxine purifiée par acide-alcool	785	25	37,500	7,575	42

Lf = quantité de toxine neutralisée par 1 U.f. d'antitoxine alpha (sérum std. Copenhague) (18)
DMH = minimum de toxine capable d'hémolyser totalement 0,1 ml d'une suspension de globules rouges de lapin
DMM = minimum de toxine qui provoque en inoculation i.d. au lapin une nécrose de 0,5 cm diamètre.

Le dosage de l'azote a été effectué par la méthode Kjeldahl.

Nous avons essayé les méthodes suivantes, en comparaison avec celle décrite plus haut: la précipitation de la toxine, par $SO_4(NH_4)_2$ à sat. (12) par l'acide trichloracétique (pH 3,5) (5,8); par l'acide acétique (pH 3,5) (16,14) et par l'acide métaphosphorique (19, 20). Toutes ces techniques ont donné des rendements inférieurs et même nuls. Ces essais ont montré que la toxine staphylococcique, de même que l'anatoxine correspondante, obtenues sur le milieu de Hottinger modifié, ne peuvent être purifiées par n'importe quelle technique.

Reynaud et coll. (19) ont obtenu, à partir de cultures de staphylocoque en milieu liquide, une alpha-toxine avec un haut degré de purification (2500—3500 Lf/mg N), à l'aide d'une technique plus laborieuse que la nôtre, comportant comme première étape une précipitation par l'acide métaphosphorique.

La toxine obtenue à partir de cultures sur milieu semi-solide n'est pas précipitée par l'acide métaphosphorique. En utilisant notre procédé, on obtient par contre, une précipitation représentant environ 40—50% de la toxine contenue dans le produit initial. Nos expériences ont été effectuées sur 10 lots de toxine brute, conservés 2 à 3 mois à +4°C ; les toxines fraîchement obtenues donnent, dans les mêmes conditions, un précipité gélatineux qui sédimente très difficilement.

Reynaud a montré que les diverses propriétés de l'alpha-toxine staphylococcique varient sensiblement et indépendamment, au cours des opérations de purification. La purification de la toxine par la méthode acide + alcool nous a donné les mêmes résultats.

Exprimant, comme Reynaud, le coefficient de purification par le rapport: activité (Lf, DMH, DMN) par mg N de la toxine purifiée/activité par mg N (exprimée par les mêmes unités) de la toxine brute, on constate que le degré de purification de notre toxine varie selon l'unité considérée (tableau III).

Tableau III

	Lf/mg N	DMH/mg N	DMN/mg N
Coefficient de purification par la méthode acide-alcool	82	1290	16
Coefficient de purification de la toxine de Reynaud et coll.	650	1800	—

Il ressort de ce tableau que si l'on considère le Lf/mg N, le coefficient de purification de la toxine obtenue est, selon notre technique, huit fois plus petit que celui de la toxine hautement purifiée, selon la technique de Reynaud et coll., tandis que si l'on considère le pouvoir hémolysant DMH/ mg de N, on constate que notre toxine, partiellement purifiée, possède plus de 70% de l'activité hémolytique de la toxine pure (Reynaud).

Par conséquent, nous confirmons les constatations de Reynaud, selon lesquelles les diverses propriétés de l'alpha-toxine staphylococcique subissent des variations indépendantes l'une de l'autre, au cours des processus de purification. Si on tient compte seulement du pouvoir hémolytique, nous pouvons conclure que par simple précipitation alcoolique de la toxine acidifiée (pH 3,5 ac. trichloracétique), on obtient une purification assez marquée (70% en comparaison de la toxine de Reynaud et coll.).

La toxine, partiellement purifiée par la méthode acide-alcool, a été soumise à l'analyse immunochimique. Dans ce but, nous avons employé: l'électrophorèse libre et sur papier, électrophorèse en gel, diffusion d'après la méthode d'Ouchterlony et l'immuno-électrophorèse.

Dans ces recherches nous avons utilisé un anti-sérum de cheval, contenant 350 Lf/ml préparé avec l'anatoxine et la toxine.

Comme dans les recherches sur l'anatoxine staphylococcique, nous avons mis en évidence trois fractions antigéniques dans la toxine brute et deux fractions dans la toxine partiellement purifiée.

Des trois fractions identifiées dans la toxine brute, celle à la plus grande vitesse de migration représente 45,25%, la fraction intermédiaire et celle à la mobilité la plus réduite représentant respectivement 30,7% et 24,05% du produit total.

Après purification de la toxine, les deux fractions restantes représentent 63,2% et 36,8% de la totalité du produit purifié.

Par la purification de la toxine brute on élimine, comme dans le cas de l'anatoxine, une des trois fractions antigéniques. Par le fait que cette disparition n'affecte pas les qualités immunologiques de la toxine purifiée, nous croyons pouvoir conclure que la fraction éliminée représente un antigène bactérien, autre que la toxine elle-même.

La chromatographie des amino-acides de la toxine partiellement purifiée est identique à celle de l'anatoxine.

L'alpha-toxine staphylococcique, purifiée par la méthode « acide-alcool » a été étudiée du point de vue action cytotoxique sur les cultures d'embryon humain en couche monocellulaire.

On a déterminé l'effet cytotoxique de la dose minimum de toxine, correspondant à environ 2,5 Lf par tube de culture. On a également étudié la neutralisation de l'effet cytotoxique par l'antitoxine respective, en utilisant non seulement des cultures en couche monocellulaire, mais aussi le test du pH.

Le titrage de l'action neutralisante de l'alpha-toxine par l'antisérum, rapporté au titrage par floculation, a montré que 7 à 8 unités floculantes neutralisaient l'effet de 10 Lf de toxine, donc 4 doses minima cytotoxiques. Cette discordance entre le titrage par floculation et celui par effet cytotoxique sur les cultures de tissus pourrait s'expliquer, soit par l'existence dans la toxine purifiée d'une certaine quantité d'anatoxine, soit par une résistance naturelle des cellules embryonnaires humaines vis-à-vis de l'alpha-toxine, soit enfin par les deux facteurs. Les résultats de ces expériences font l'objet d'un autre mémoire (MESROBEANU I-et coll. (24)).

BIBLIOGRAPHIE

1. AMOUREUX G. et YEU F. — Ann. Inst. Pasteur, 1950, **79,** 913.
2. BURNET F. M. et FREEMAN M. — J. Path. a. Bact., 1932, **35,** 477.
3. BOIVIN A. et IZARD Y. — C. R. Soc. Biol., 1937, **74,** 25.
4. BOIVIN A. et MESROBEANU L. — Rev. d'Immunol., 1936, **1,** 553.
5. BOIVIN A. — C. R. Acad. Sci., 1936, **203,** 284.
6. COMBIESCO C., MESROBEANU L., NICOLESCO M., MITRICĂ N. et. RETEZEANU. A. — Rev. Ig. Microbiol., Epidemiol., 1952, **2,** 18.
7. COMBIESCO C., SARAGEA A. et MAXIMESCO P. — Arh. Rom. Epidemiol., Microbiol., 1956, 492.
8. DAVIDOV I. K. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1958, **29,** Nr. 4, 102
9. d'ANTONA D. — Archives Belges, 1959, **7,** 543.
10. WALPOLE G. A. — Biochem. J., 1915, **9,** 298.
11. GRABAR P. et WILLIAMS V. — Biochim biophys, Acta, 1955, **10,** 67.
12. HOLT L. B. — Brit. J. Exp. Pathol., 1936, **17,** 318.
13. HOTTINGER M. — Ztschrift. f. Bakteriologie, Orig., 1913, **67,** 178.
14. KOMKOVA O. et LAWROWA A. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1935, **14,** Nr. 4. 26.
15. MESROBEANU L. et MITRICĂ N. — Med. Internă, 1958, **8,** 1273.
16. NELIS P., BOURKAERT J. J. et PICARD E. — Ann. Inst. Pasteur, 1934, **52,** 597.
17. OUCHTERLONY O. — Acta Path. Microbiol. Scand, 1953, **32,** 231.
18. RAMON G., BOIVIN A. et RICHOU R. — C. R. Soc. Biol., 1937, **124,** 88.
19. REYNAUD M., RELYVELD E. H., TURPIN A. et MANGALO R. — Ann. Inst. Pasteur, 1959, **96,** 60.

0. Schmidt S. et Kjaer K. — C. R. Soc. Biol., 1930, **53**, 1307.
1. Tkistovitci G. M. — Jurn. Mikrobiol., Moscou, 1955, **11**, 56.
2. Uriel J. et Grabar P. — Ann. Inst. Pasteur, 1956, **90**, 427.
3. Vagodcikov G. V. — Microbiol. Imunol. afecţiunilor stafilococice — Medghiz, 1950, Moscou.
4. Mesrobeanu I., Georgesco M., Ieremia T., Mitrică N., Drăghici D. et Mateesco. M. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1960, 19, ce numéro.

ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА СТАФИЛОКОККОВОГО АНАТОКСИНА И АЛЬФА—ТОКСИНА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В работе описывают способ частичной очистки стафилококкового анатоксина и альфа-токсина (способ Месробяну-Митрикэ). Токсин получается путём выращивания штамма уд 46 на полутвердой среде по рецепту Комбиеску и сотр. Анатоксин получается путём безвреживания токсина при помощи 4‰ формалина.

Методика очистки токсина состоит из осаждения с двумя об"емами 96°-ного спирта, ативного препарата, доведенного до рн 3,5 при помощи трихлоруксусной кислоты.

Осадок, образующийся тот час же при обработке анатоксина и через 20 минут при бработке токсина, центрифугируется и затем разводится в шелочном расствоpe при рн .8—8,2.

Выход составляет 90% при обработке анатоксина и 50% при обработке токсина. Час— ично очищенные токсин и анатоксин содержат 800—900 Lf/mgN; скорость флокуляции-kf авна или превосходит kf нативного препарата.

Химическое и иммунохимическое изучение дало возможность выявити у нативного атоксина и токсина наличие трех антигенных фракций, в то время как очищенные пре-араты содержат только 2 антигенные фракции, причем иммунологическая ценность препа-атов не страдает из за этого.

Анатоксин, очищенный данным способом, применяется уже 10 лет в производстве нститута Др И. Кантакузино.

DIE PARTIELLE REINIGUNG DES ALPHA-STAPHYLOKOKKENTOXINS UND TOXOIDS.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird ein Verfahren zur partiellen Reinigung von Alpha-Staphylokok-entoxin und — Toxoid beschrieben (Methode von Mesrobeanu-Mitrică). Das Toxin wird urch Züchtung des Stammes Wood 46 auf einem halbfesten Nährboden, nach den Angaben on Combiescu u. Mitarb., gewonnen. Das Toxoid wird durch Entgiftung des Toxins mit /00 Formol erhalten.

Das Reinigungsverfahren besteht in Fällung des mit Trichloressigsäure auf pH 3,5 gesäuerten Rohrproduktes mit zwei Volumen 96-grädigem Alkohol.

Der, im Falle des Toxoids sofort, im Falle des Toxins, nach 20 Minuten, gebildete Nie-erschlag wird abzentrifugiert und in alkalischer Lösung (pH 7,8—8,2) wieder gelöst.

Der Ertrag ist 90% beim Toxoid und 50% beim Toxin. Die partiell gereinigten Toxine nd Toxoide enthalten 800—900 Lf/mg N und sind, was den Kf-Wert anbetrifft, den Rohpro-ukten gleichwertig oder überlegen.

Durch chemische und immunochemische Untersuchungen wurden im Rohtoxin und Toxoid drei Antigenfraktionen nachgewiesen, während die gereinigten Produkte nur zwei ntigenfraktionen enthalten, ohne dass ihr immunologischer Wert beeinträchtigt wäre.

Das nach diesem Verfahren gereinigte Toxoid wird seit 10 Jahren vom « Dr. I. Canta-zino » — Institut laufend hergestellt.

ARTIAL PURIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL ALPHA-TOXOID AND-TOXIN

SUMMARY

The present paper contains the description of a method for the partial purification of taphylococcal alpha-toxoid and toxin (method of Mesrobeanu — Mitrică). The toxin is btained by culturing the Wood 46 strain in a semi-solid medium as described by Combiescu al., The toxoid is prepared by detoxification of the toxin with 4‰ formol.

The method of toxin purification consists in precipitation of the raw product which has been adjusted to pH 3.5 with trichloracetic acid, by 2 volumes of 96° alcohol.

The precipitate which is immediately formed in the case of toxoid, and at the end of 20 minutes in the case of toxin, is separated by centrifugation and taken up in an alkaline solution (pH 7.8—8.2).

The yield amounts to 90% of the toxoid and to 50% of the toxin. Partially purified toxin and toxoid contain from 800 to 900 Lf/mg. N, while the Kf is the same or considerably shorter than in the case of the raw products.

Chemical and immunochemical investigations demonstrated the presence of 3 antigen fractions in raw toxoid or toxin, while only 2 antigen fractions are present in the purified products, the immunological value of the latter remaining, however, unimpaired.

Toxoid purified by this method has been used for the past ten years in the routine production of the « Dr. I. Cantacuzino" Institute.

LE MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ DANS LA BRUCELLOSE

II. MODIFICATIONS HISTO-PATHOLOGIQUES CHEZ LES COBAYES INFECTÉS XPÉRIMENTALEMENT, SOUMIS À L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS MODIFICATEURS DE L'IMMUNITÉ

par

C. Bonciu, Ofelia Dimitriu, Th. Vasilesco et Al. Cerbu

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services des Zoonoses et d'Anatomie Pathologique)

— Manuscrit reçu le 9 juillet 1959 —

L'infection brucellique produit dans l'organisme des modifications du ystème réticulo-histiocytaire (SRH) qui mènent, du point de vue histo-patho-gique, à la formation du granulome brucellique. Cette lésion se développe raduellement comme une conséquence des processus prolifératifs des cellules u SRH avec prédominance, dans la phase du début, de la prolifération es cellules épithélioïdes et, dans la phase tardive, (120—140 jours) du granu-me brucellique typique (Braude/3/). La phase finale du processus se traduit ar l'apparition de la sclérose au niveau des anciennes lésions granulomateuses s tissus et des organes.

On s'est posé la question de savoir si l'immunité post-infectieuse dans la rucellose est suffisamment forte pour prévenir une réinfection. Kelly (1953/6/), xpérimentant sur les cobayes, a démontré que l'immunité développée à la ite de l'infection primaire, s'installe très lentement, l'animal ayant besoin e 12—24 semaines pour devenir réfractaire aux infections ultérieures.

L'immunisation active par le vaccin vivant atténué, préconisée par l'école oviétique (Zdrodovski (8), Versilova et Kokorin (7), etc.) représente un moyen e stimuler l'immunité, qui a donné des résultats même chez les individus expo-s accidentellement aux infections brucelliques. Il est bien connu que la souche vante atténuée, par sa présence prolongée dans l'organisme, active les moyens e défense (histogénèse, élaboration des anticorps, parmi lesquels les opsonines raient un rôle dans l'activation des processus de phagocytose, ce qui confé-rait à l'organisme une résistance à l'infection ultérieure avec des germes rulents).

Le système réticulo-histiocytaire (SRH), dont la réactivité est spécialement licitée dans l'infection brucellique, ainsi que l'état d'intégrité du système erveux central (SNC), qui règle la réponse immunologique dans les processus fectieux, ont un rôle important dans le mécanisme de défense de l'organisme ntre cette infection.

Ces faits nous ont déterminé à étudier dans quelle mesure la modification l'état fonctionnel normal de ces deux systèmes, réalisée par le blocage du H et par la provocation et le maintien de l'état d'excitation ou d'inhibition u SNC (chez les cobayes vaccinés et réinfectés expérimentalement), peut apporter

de nouvelles données sur l'installation des modifications de l'immunité en présence de ces facteurs.

Mentionnons, qu'à notre connaissance, la littérature n'offre pas des données concernant les modifications histo-pathologiques survenues dans l'infection brucellique expérimentale des cobayes, par rapport aux états physiologiques des systèmes réticulo-histiocytaire et nerveux central.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été effectuées sur 450 cobayes, de 350—400 g. répartis en 30 groupes, selon le schéma: 1/ avec le SRH bloqué; 2/ avec le SNC en état d'excitation modérée et prolongée; 3/ avec le SNC en état d'inhibition modérée et prolongée; 4/ témoins. Le protocole de l'expérience a été exposé dans les notes antérieures (4, 5).

Les animaux ont été vaccinés avec 2×10^9 germes de la souche de Brucella abortus B_{19} (souche vaccinante); 30 jours après, on a procédé à leur inoculation, en deux groupes: l'un avec la souche Br. abortus S_6 (2×10^9 germes) et l'autre avec la souche Br. abortus V (5×10^9 germes). La dose infectante minimum a été de 10^5 pour Br. abortus S_6 et de 10^4 pour Br. ab. V.

Le blocage du SRH a été produit et maintenu par des injections hebdomadaires, intrapéritonéales, d'un ml de bleu de trypan 1%, en solution chlorurée 0,85%, pendant 195 jours (durée de l'expérience).

Les modifications du SNC réalisées: excitation relative — par administration quotidienne de 0,003 g benzédrine (voie gastrique); inhibition modérée et prolongée — par administration quotidienne de 0,03 g luminal par voie sous-cutanée ou gastrique.

On a étudié les lésions histo-pathologiques en sacrifiant les cobayes à 30, 60, 90 et 120 jours à partir de l'infection (examen macroscopique et cultures des organes, à fin d'isoler les germes) et on a contrôlé en même temps l'évolution de l'infection brucellique du point de vue sérologique et allergique.

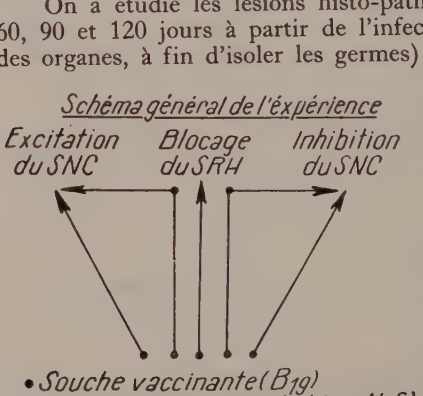


Schéma général de l'expérience
Excitation du SNC
Blocage du SRH
Inhibition du SNC
• Souche vaccinante (B19)
• Souche infectante (Ab.Vit. ou Ab.6)
• Souche vaccinante + souche infectante

Les lésions histo-pathologiques ont été réparties comme suit:

A. *Lésions caractéristiques*

— Granulome brucellique, formé par des cellules épithélioïdes et des histolymphocytes, avec ou sans réactions fibro-blastique et parfois avec des cellules géantes polynucléées (type Langhans) ou transformations purulentes (masse de polynucléaires neutrophiles dans le centre du granulome).

B. *Lésions non-caractéristiques*:

1. *Lésions dégénératives* prononcées *de l'épithélium séminal*, mentionnées seulement chez les cobayes sacrifiés, dans le cas de disparition quasi-totale de l'épithélium séminal, à l'exception de spermatogonies; les cas avec lésions atténuées ont été omis, vu leur fréquence post-mortem chez les cobayes normaux (autolyse) ainsi que chez les cobayes avec avitaminose E et A. (2).

2. *Lésions de hyalinose périfolliculaire de la rate.* Ces lésions ont été également observées, par l'un d'entre nous (1) chez la souris blanche, cliniquement normale, étant dues au régime alimentaire (lait altéré), exacerbées par l'association d'une infection microbienne ou virotique; on a également rencontré ces lésions chez les cobayes d'élevage avec affections pulmonaires ou tuberculose expérimentale généralisée (2% sur 3300 animaux contrôlés).

3. *Hyperplasie du tissu réticulo-histiocytaires des ganglions et de la rate.*

4. *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltrations histio-lymphocytaires dans le foie.*

5. *Macrophages ferriques dans la rate*, notés seulement dans le cas où on les a observés en nombre anormalement grand, ces éléments étant fréquemment rencontrés chez les cobayes, cliniquement normaux.

6. *Foyers d'alvéolite proliférative.*

Les granulocytes éosinophiles de la rate n'ont pas été mentionnés, vu leur fréquence chez les cobayes cliniquement normaux.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont analysés du point de vue de l'état du SRH et du SNC, des cobayes vaccinés et infectés, par rapport aux témoins. Etant donné le nombre important d'organes et de réactions histo-pathologiques examinés, les résultats sont exprimés en pourcentages, séparément pour chaque type de lésion et chaque groupe d'animaux en expérience.

I. *Blocage du* SRH obtenu par injections hebdomadaires de bleu de trypan— légère hyperplasie des cellules Kupffer, ainsi que de légères infiltrations intertrabéculaires avec histiocytes et lymphocytes dans le foie (75%). Parfois, la rate présente de nombreux macrophages ferriques.

II. *Cobayes vaccinés avec la souche Br. Ab.* B_{19}. Les résultats sont exposés dans le tableau I.

Des données du tableau I, il ressort:

A. *Lésions caractéristiques.* 1. — La vaccination avec la souche Br. Ab. B_{19} ne produit pas de lésions caractéristiques, pendant toute la durée de l'expérience (180 jours); le blocage n'influence pas leur apparition.

2.— Excitation modérée et prolongée du SNC (par benzédrine) — lésions spécifiques dans les ganglions (33%); leur fréquence diminue (25%) par association du blocage du SRH.

3.— L'inhibition modérée et prolongée du SNC (par luminal) — n'influence pas l'apparition des lésions, indifféremment de l'état du SRH.

B. *Lésions non-caractéristiques.* 1. — *Lésions dégénératives de l'épithélium seminal* — dans 60% des cas; le blocage du SRH les réduit à 48%. L'excitation du SNC augmente leur proportion à 86%; à la suite de l'inhibition du SNC elles diminuent à 36%.

2. — *Hyalinose périfolliculaire de la rate* — n'a pas été observée.

3. — *Hyperplasie des tissus RH* (ganglions et rate), — présente dans 78% des cas, réduite par le blocage du SRH à 50%, augmente par l'administration de la benzédrine à 100% et diminue (67%) par l'emploi du luminal; l'association des modifications du SNC au blocage les réduit à 50%.

4. — *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltrations histio-lymphocytaires dans le foie* — dans tous les cas (100%) indifféremment de l'état physio-pathologique.

Tableau 1

Cobayes vaccinés avec la souche *Br.Ab.*B_{19}

	Lésions observées chez les cobayes — %					
	Vaccinés	Vaccinés, SRH bloqué	Vaccinés SNC excité	Vaccinés SNC inhibé	Vaccinés SRH bloqué SNC excité	Vaccinés SRH bloqué SNC inhibé
Période d'observation	5—177 jours	5—130 jours	16—147 jours	16—177 jours	16—133 jours	16—133 jours
A. *Lésions caractéristiques*						
— dans les ganglions . . .	—	—	33	—	25	—
— dans la rate	—	—	—	—	25	—
— dans le foie	—	—	—	—	12,5	—
B. *Lésions non-caractéristiques*						
1. dégénératives de l'épithélium séminal	17*)	0**)	67	—	50	—
2. hyalinose périfolliculaire de la rate	—	—	—	—	—	—
3. hyperplasie du tissu RH (ganglions et rate) . . .	78	50	100	67	—	—
4. hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocitaire dans le foie	100	100	100	100	100	100
5. macrophages ferriques dans la rate	100	50	67	67	100	75
6. foyers d'alvéolite proliférative	40	—	67	33	50	25

*) les premiers 40 jours après l'inoculation, ces lésions ont été trouvées dans 60% des cas.
**) les premiers 40 jours après l'inoculation, ces lésions ont été trouvées dans 40% des cas.
— = on n'a pas observé de lésions.

5. — *Macrophages ferriques dans la rate* — leur fréquence et leur intensité varie en rapport avec l'état fonctionnel du SRH et du SNC.

6. — *Foyers d'alvéolite proliférative* — dans 40% des cas; le blocage du SRH empêche l'apparition des lésions, l'excitation du SNC les augmente (67%), l'inhibition les réduit (33%). L'association du blocage aux modifications du SNC diminue la fréquence des lésions (soit 50 et 25%).

III. *Cobayes infectés avec la souche Br. Ab.* S_6. Les résultats obtenus par l'inoculation des cobayes avec la souche Br. Ab. S_6, sont montrés dans le tableau II.

De l'analyse des données du tableau II, ressort:

A. *Lésions caractéristiques*, 1. — granulomes brucelliques dans 88% des cas, apparus — par ordre de fréquence — dans les ganglions, la rate et le foie, variant en rapport avec l'état physiologique de l'organisme (de 25 à 100%). Le blocage du SRH diminue nettement, la fréquence des lésions, dans tous les cas, (SNC non-modifié-88 à 33%; excitation 100 à 50%, inhibition — 50 à 25%).

2. — L'excitation du SNC augmente la fréquence des lésions (SRH normal — 100%, SRH bloqué — 50%).

Tableau 11

Cobayes infectés avec la souche *Br.Ab.S*$_6$

	Lésions observées chez les cobayes — %					
	Infectés	Infectés SRH bloqué	Infectés SNC excité	Infectés SNC inhibé	Infectés SRH bloqué SNC excité	Infectés SRH bloqué SNC inhibé
Période d'observation	39—166 jours	39—130 jours	38—127 jours	38—127 jours	5—127 jours	8—127 jours
A. *Lésions caractéristiques (total)*	88	33	100	50	50	25
- dans les ganglions . . .	75	33	100	50	50	25
- dans la rate	63*)	33	100	50	50	—
- dans le foie	14	—	—	—	—	—
B. *Lésions non-caractéristiques*						
dégénératives de l'épithélium séminal	20	33	50	25	—**)	—
hyalinose périfolliculaire de la rate	13	—	—	—	25	—
hyperplasie des tissus RH (ganglions, rate)	75	67	100	100	50	50
hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire dans le foie	100	100	100	100	100	100
macrophages ferriques dans la rate	50	100	100	100	100	75
foyers d'alvéolite proliférative	67	50	100	50	75	50

*) dans 20% des cas nécrose des nodules.
**) lésions dégénératives testiculaires n'ayant pas été prises en considération, vu que les animaux sont morts avant d'avoir été sacrifiés.
— = on n'a pas observé de lésions.

3. — L'inhibition du SNC produit la diminution de la fréquence des lésions.

B. *Lésions non-caractéristiques.* 1. — *Lésions dégénératives de l'épithélium séminal* — plus fréquentes chez les animaux en état d'excitation (de 20 à 50%); le blocage du SRH exerce une action variable.

2. — *Hyalinose périfolliculaire de la rate* — dans 13% des cas (la souche vaccinante B_{19} ne provoque pas de lésions).

3. — *Hyperplasie du tissu RH (ganglions et rate)* — dans 75% des cas; plus fréquente à la suite des modifications du SNC (100%) et diminuée par l'association du blocage du SRH (50%).

4. — *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltrations histio-lymphocytaires dans le foie* — 100% des cas, indifféremment de l'état physio-pathologique.

5. — *Macrophages ferriques dans la rate* — dans 50% des cas; leur fréquence augmente à 100%, à la suite des modifications physio-pathologiques.

6. — *Foyers d'alvéolite proliférative* — plus fréquentes par l'administration de la benzédrine (SRH normal 67—100%; SRH bloqué 50—70%); l'inhibition

diminue la fréquence des lésions (67—50%); le blocage du SRH les réduit, indifféremment de l'état du SNC.

IV. *Cobayes vaccinés avec la souche B_{19} et infectés avec la souche Br. Ab. S_5* — les résultats sont exposés dans le tableau III.

Tableau III

Cobayes vaccinés et infectés avec la souche *Br.Ab.*S_6

	Lésions observées chez les cobayes—%					
	Vaccinés et infectés	Vaccinés infectés SRH bloqué	Vaccinés infectés SNC excité	Vaccinés infectés SNC inhibé	Vaccinés infectés SRH bloqué SNC excité	Vaccinés infectés SRH bloqué SNC inhibé
Période d'observation	39—166 jours	39—130 jours	38—127 jours	38—127 jours	5—127 jours	8—127 jours
A. *Lésions caractéristiques*						
— dans les ganglions . .	17	14	43	20	23	9
— dans la rate	17	14	43	20	23	9
— dans le foie	—	—	—	—	5	—
— dans les testicules . .	—	—	14	—	—	—
B. *Lésions non-caractéristiques*						
1. dégénératives de l'épithélium séminal . . .	25	25	60	0	80	50
2. hyalinose périfolliculaire de la rate	17	—	29	20	18	6
3. hyperplasie du tissu (ganglions, rate) . . .	50	67	50	40	67	80
4. hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire dans le foie	25	100	100	100	100	100
5. macrophages ferriques dans la rate	100	100	86	80	87	80
6. foyers d'alvéolite proliférative	50	50	67	40	60	30

— = on n'a pas observé de lésions.

Analysant les données du tableau III, on constate:

A. *Lésions caractéristiques.* 1. — L'association de la vaccination a diminué la fréquence des lésions (de 88 à 17%).

2. — Les modifications du SNC augmentent la fréquence des lésions (43% — excitation, 20% — inhibition).

3. — L'association du blocage diminue dans tous les cas la fréquence des granulomes brucelliques (SNC normal — 14%; SNC excité — 23% et SNC inhibé — 9%).

B. *Lésions non-caractéristiques.* 1. — *Lésions dégénératives de l'épithélium séminal* — dans 25% des cas (chiffre inférieur à celui présenté par les infections avec B_{19} et S_6); elles augmentent en présence de l'excitation (60%); l'inhibition les réduit à 0.

2. — *Hyalinose périfolliculaire de la rate* — 17% des cas. Les modifications u SNC augmentent leur fréquence, notamment sous l'influence de la benzérine (29%). Le blocage du SRH n'a donné des lésions qu'en association avec s modifications du SNC.

3. — *Hyperplasie du tissu RH (rate et ganglions)* — observée dans tous s cas; la vaccination n'exerce pas d'influence significative.

4. — *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire dans foie* — n'a pas été influencée par la vaccination.

5. — *Macrophages ferriques dans la rate* — n'ont pas été influencés par vaccination.

6. — *Foyers d'alvéolite proliférative* — observés en pourcentage plus réduit 0%) par rapport à celui présenté par les cobayes non-vaccinés avec SNC ormal (67%).

V. *Cobayes infectés avec la souche Br. ab. V.* — les résultats sont exposés ans le tableau IV.

Tableau IV

Cobayes infectés avec la souche *Br.Ab. V*

	Lésions observées chez les cobayes — %		
	Infectés	Infectés SNC excité	Infectés SNC inhibé
Période d'observation	30—86 jours	74—117 jours	60—117 jours
A. *Lésions caractéristiques*			
- dans les ganglions	44	67	25
- dans la rate	44	67	—
- dans le poumon	1	—	—
- dans le testicule	1*)	—	—
B. *Lésions non-caractéristiques*			
dégénératives de l'épithélium séminal	—	100	—
hyalinose proliférative de la rate	11	—	—
hyperplasie du tissu RH (ganglions et rate)	20	67	50
hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire du foie	33	100	50
macrophages ferriques (rate)	33	67	50
foyers d'alvéolite proliférative	50	100	50

*) orchite chronique scléreuse avec abcès et lésions caractéristiques à seul testicule.
— = on n'a pas observé de lésions.

L'analyse des données du tableau IV, montre:

A. *Lésions caractéristiques* — dans 44% des cas, variant en fonction des odifications du SNC (excitation — 67%, inhibition 25%).

B. *Lésions non-caractéristiques.* 1. — *Lésions dégénératives de l'épithélium minal* — dans 100% des cas en présence de l'excitation du SNC.

2. — *Hyalinose périfolliculaire de la rate* est rarement observée (11%), s modifications du SNC n'exercent pas d'influence.

3. — *Hyperplasie du tissu RH (ganglions et rate)* — a été plus fréquente ans les cas de modification du SNC (excitation et inhibition).

4. — *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire dans le foie* — dans 100% des cas en présence de l'excitation; l'administration du luminal réduit la fréquence des lésions, étant néanmoins supérieure à celles produites par la simple infection.

5. — *Macrophages ferriques dans la rate* — observés dans 33% des cas, leur fréquence augmentant en présence de l'excitation (67%) et de l'inhibition (50%) du SNC.

6. — *Foyers d'alvéolite proliférative* — dans 100% des cas à la suite de l'excitation; l'inhibition du SNC n'influence pas la fréquence des lésions en comparaison avec l'infection non-associée.

VI. *Cobayes vaccinés avec la souche B_{19} et infectés avec la souche Br. Ab. V*; les résultats sont exposés dans le tableau V.

Tableau V

Cobayes vaccinés et infectés avec la souche *Br.Ab.V*

	Lésions observées chez les cobayes — %					
	Vaccinés et infectés	Vaccinés infectés SRH bloqué	Vaccinés infectés SNC excité	Vaccinés infectés SNC inhibé	Vaccinés infectés SRH bloqué SNC excité	Vaccinés infectés SRH bloqué SNC inhibé
Période d'observation	47—147 jours	47—147 jours	47—150 jours	47—147 jours	45—150 jours	45—150 jours
A. *Lésions caractéristiques*						
— dans les ganglions . .	20	20	50	20	—	20
— dans la rate	—	—	—	20	—	—
— dans le foie	—	—	—	—	33	—
B. *Lésions non-caractéristiques*						
1. dégénératives de l'épithélium séminal . . .	—	50	25	40	25	25
2. hyalinose périfolliculaire de la rate	—	—	—	—	—	—
3. hyperplasie du tissu (ganglions, rate) . . .	60	50	25	60	75	25
4. hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaire du foie	20	75	50	40	66	50
5. macrophages ferriques dans la rate	20	25	25	20	25	25
6. foyers d'alvéolite proliférative	20	75	75	60	50	75

— = on n'a pas observé de lésions.

Des données du tableau V, il ressort:

A. — *Lésions caractéristiques.* 1. — dans 20% des cas (les animaux non-vaccinés ont présenté ces lésions dans 44% des cas).

2. — Sous l'influence de la benzédrine le pourcentage des lésions est de 50%; leur fréquence n'est pas modifiée par l'emploi du luminal.

3. — Le blocage du SRH n'exerce pas d'influence sur la fréquence des lions, à l'exception des cobayes en état d'excitation chez qui la proportion diminué de 50 à 33%.

B. — *Lésions non-caractéristiques.* 1. — *Lésions dégénératives de l'épithélium minal* — observées dans tous les cas avec blocage du SRH et modifications SNC (excitation et inhibition) le pourcentage variant de 25 à 50%.

2. — *Hyalinose périfolliculaire de la rate* — n'a pas été observée.

3. — *Hyperplasie du tissu* RH (*ganglions et rate*) — a été constatée plus fréquemment (60%) chez les cobayes vaccinés.

4. — *Hyperplasie des cellules Kupffer et infiltration histio-lymphocytaires dans le foie.* Fréquence variable des lésions dans tous les cas, le blocage du SRH déterminant une augmentation.

5. — *Macrophages ferriques dans la rate* — dans tous les cas.

6. — *Foyers d'alvéolite proliférative* — dans tous les cas.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Analysant les modifications histo-pathologiques par rapport aux souches de Brucella utilisées on constate:

a) *La souche vaccinante* B_{19}, inoculée aux cobayes normaux, observés pendant 177 jours, ne provoque pas de lésions caractéristiques - granulome nucellique. Les animaux vaccinés ont été sacrifiés, tous les 5 jours, pendant les premiers 40 jours de l'expérience et ensuite à 60, 90, 120, 150 et 177 jours.

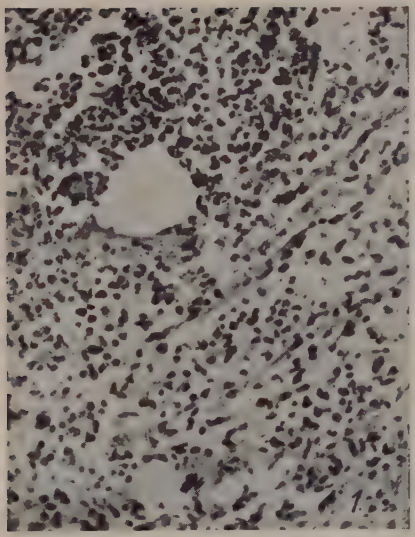
Nos observations diffèrent de celles de VERŞILOVA et KOKORIN (7) qui en effectuant l'expérience avec une souche moins pathogène pour les cobayes (variante BA de la souche B_{19}) ont réussi parfois à mettre en évidence des formations nodulaires granulomateuses.

Ces auteurs, en employant la variante BA de la souche B_{19}, ont rarement observé des lésions dégénératives nettes dans les organes, tandis que, dans nos expériences, la souche B_{19} ne provoque que des lésions non-caractéristiques prononcées (lésions marquées de l'épithélium séminal (60%), foyers d'alvéolite proliférative (40%), hyperplasie du tissu RH du foie et de la rate (78%), hyperplasie des cellules Kupffer (100%), etc.

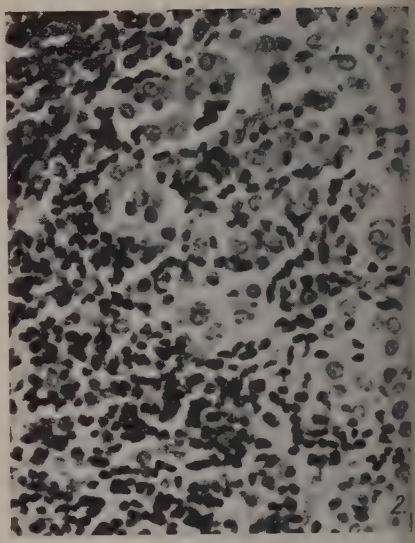
b) *La souche infectante Br. Ab.* S_6, dans nos conditions expérimentales, a provoqué le granulome brucellique dans 88% des cas, (rate, ganglions, foie), ainsi que des lésions non-caractéristiques (hyalinose périfolliculaire splénique (3%), foyers d'alvéolite proliférative (67%), lésions dégénératives de l'épithélium séminal, avec conservation des spermatogonies et des cellules Sertoli (20%), hyperplasie des cellules Kupffer (100%), etc.).

c) *La souche infectante Br. Ab. V.* a provoqué des lésions spécifiques dans 44% des cas (ganglions et rate (44%), poumon (25%), testicule (1%).)

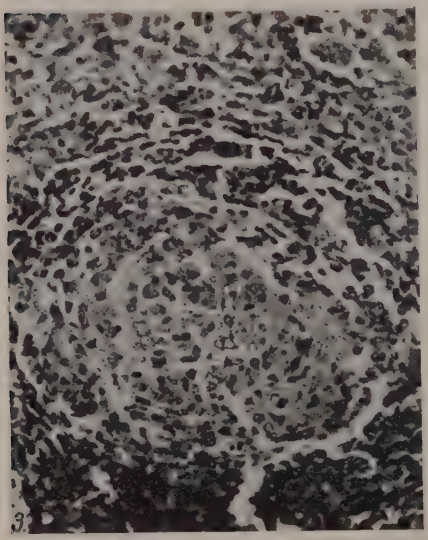
Les lésions non-spécifiques de hyalinose périfolliculaire splénique ont été observées dans 11% des cas; l'hyperplasie du tissu RH dans la rate et les ganglions a été réduite (20%), par rapport au pourcentage présenté (60) par les cobayes vaccinés et infectés avec cette souche, fait qui peut s'expliquer par l'inhibition de la réaction du RH, déterminée par la souche virulente. Cette observation montre que l'excitation du SRH joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections, son inhibition aidant la propagation de l'infection.



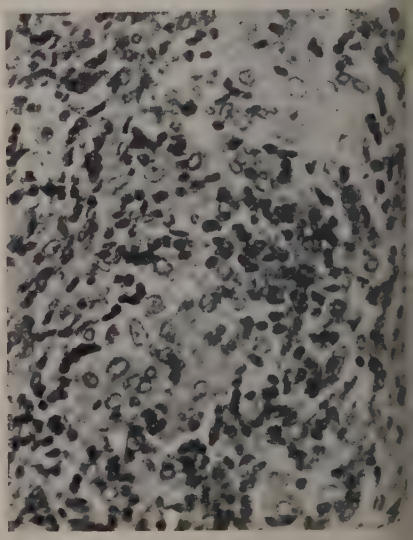
Microphot. 1. — *Point d'inoculation*: nodule de fibroblastes, épithélioïdes, mononucléaires, cellule géante multinucléée, polynucléaires — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. S_6.)



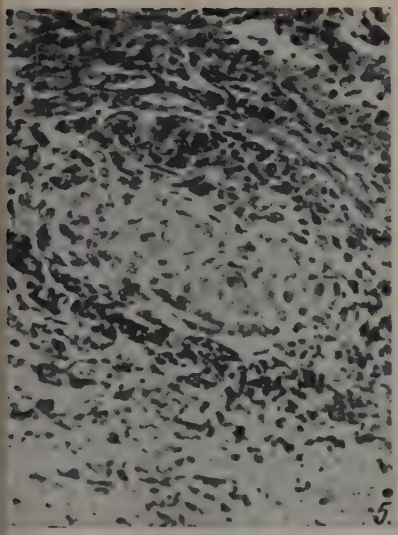
Microphot. 2. — *Ganglion*: nodules d'épithélioïdes et mononucléaires — × 400 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. B_{19}, traité par benzédrine)



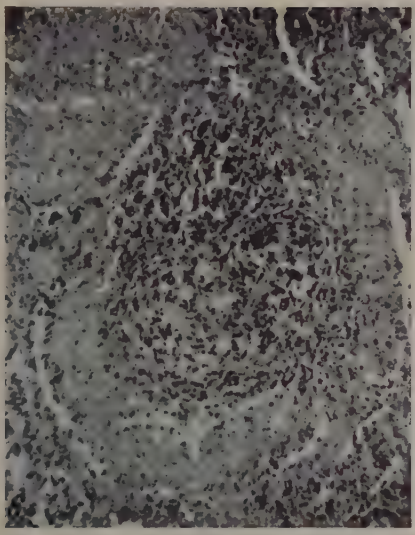
Microphot. 3. — *Ganglion :* nodule d'épithélioïdes et mononucléaires, — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. S_6)



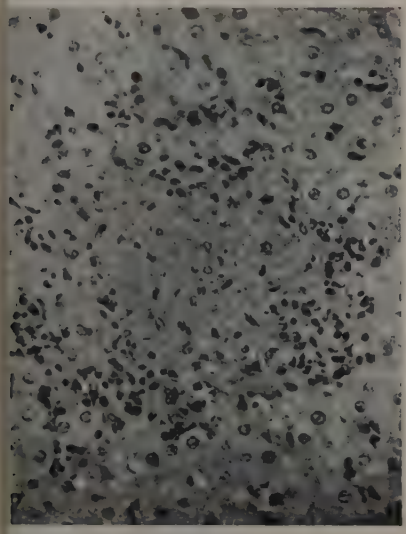
Microphot. 4. —*Rate :* nodule d'épithélioïdes et mononucléaires — × 400 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. S_6, traité par luminal)



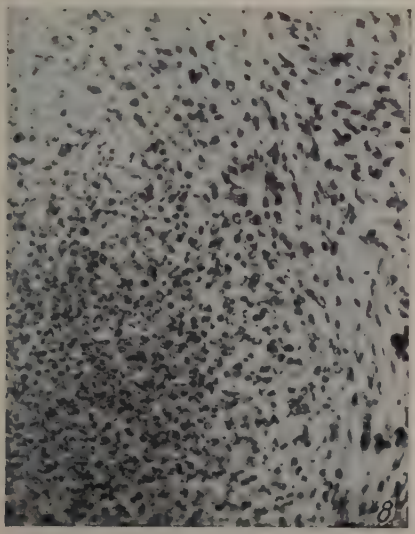
Microphot. 5. — *Rate :* nodule d'épithélioïdes, fibroblastes et mononucléaires — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. V et traité par benzédrine)



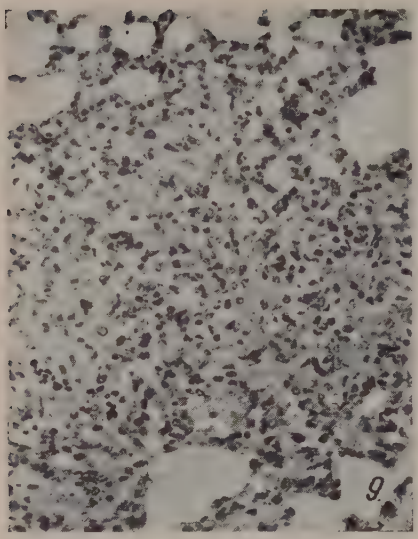
Microphot. 6. — *Rate :* hyalinose périfolliculaire — × 100 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. V)



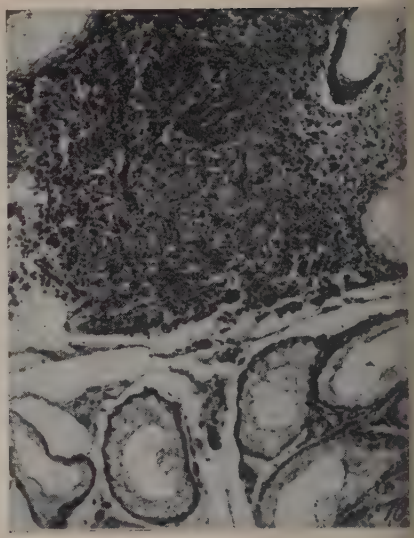
Microphot. 7. — *Foie :* nodule d'épithélioïdes mononucléaires — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. S_6)



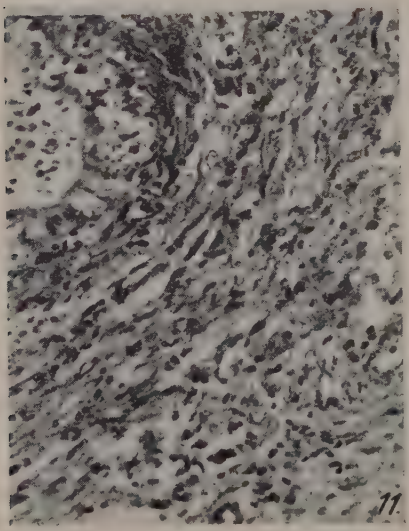
Microphot. 8. — *Foie :* nodule de fibroblastes, épithélioïdes, mononucléaires et de nombreux polynucléaires au centre — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. S_6 et traité par benzédrine)



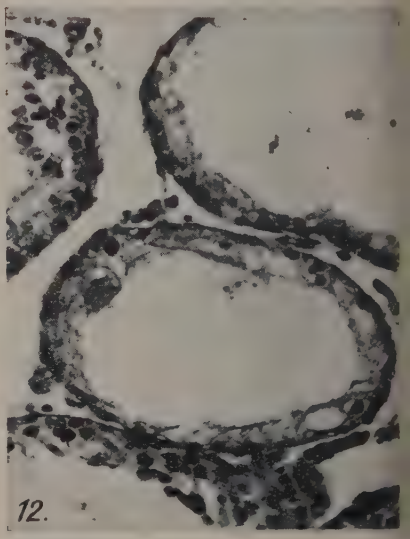
Microphot. 9. — *Poumon :* foyers d'alvéolite proliférative — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. V)



Microphot. 10. — *Testicule :* nodule de fibroblastes, épithélioïdes et mononucléaires — × 100 (Cobaye bloqué avec du bleu de trypan, vacciné avec Br. Ab. B_{19}, infecté avec Br. Ab. S_6, traité pour luminal)



Microphot. 11. — *Testicule :* Orchite chronique scléreuse — × 240 (Cobaye inoculé avec Br. Ab. V)



Microphot. 12. — *Testicule :* lésions dégénératives prononcées de l'épithélium séminal — × 240 (Cobaye vacciné avec Br. Ab. B_{19}, inoculé avec Br. Ab. S_6 et traité par benzédrine)

La vaccination préalable des cobayes infectés ultérieurement avec des souches virulentes — Br. Ab. S_6 et Br. Ab. V. — a comme effet histo-pathologique la réduction des lésions caractéristiques, ainsi que des lésions non-caractéristiques.

Dans la littérature consultée nous n'avons pas trouvé de données concernant l'influence exercée par la modification du SRH (blocage du système) sur les processus histo-pathologiques caractéristiques de la brucellose, ni des données sur l'état d'inhibition ou d'excitation du SNC.

Nos expériences prouvent que le blocage du SRH a réduit la proportion des lésions, caractéristiques et non-caractéristiques, cette réduction s'explique par le fait que le blocage intense et soutenu du SRH diminue, retarde ou inhibe la réactivité histo-formatrice. Ces résultats ont été concordants dans toutes les expériences, indifféremment de la souche utilisée ou des facteurs associés.

En ce qui concerne l'état fonctionnel du SNC on a constaté que son excitation (par benzédrine) augmente la réactivité du SRH (lésions caractéristiques chez 33% des cobayes inoculés avec la souche vaccinante B_{19}, qui ne provoque pas de granulome brucellique chez les cobayes avec le SNC intact). La proportion de ces lésions augmente en cas d'infections avec les souches virulentes (S_6 et V).

L'état d'inhibition du SNC (par luminal) diminue ou inhibe la réactivité du SRH, réduisant le pourcentage des lésions caractéristiques obtenues par l'excitation du SNC. Ce pourcentage diminue de manière plus marquée à la suite de l'association du blocage du SRH.

Les lésions non-caractéristiques sont également influencées par les modifications du SNC ,modifications qui exercent leur influence sur toutes les cellules vivantes, capables de réagir, ce qui a été également démontré par RAZENKOV ET COLL. (cité par ZDRODOVSKI (8)).

Les résultats obtenus dans nos expériences ,par l'introduction des facteurs qui modifient l'état du SRH et du SNC, concordent avec les résultats exposés (mêmes conditions expérimentales) dans les travaux antérieurs sur l'évolution des anticorps et l'allergie (4, 5).

CONCLUSIONS

1. Les modifications histo-pathologiques chez les cobayes infectés expérimentalement avec des souches de Brucella varient en rapport avec: la virulence de la souche inoculée, la vaccination préalable, l'état d'intégrité ou du blocage du système réticulo-histiocytaire et les modifications du système nerveux central (excitation, inhibition).

2. La souche vaccinante ne provoque pas de lésions caractéristiques (granulome brucellique); les souches infectantes Br. Ab. S_6 et Br. Ab. V provoquent le granulome brucellique dans un pourcentage élevé; la vaccination préalable le réduit.

3. Le blocage du système réticulo-histiocytaire réduit le pourcentage des lésions-caractéristiques et non-caractéristiques en inhibant la réactivité du système.

4. L'excitation du système nerveux central a augmenté la réactivité du système réticulo-histiocytaire, montrant un pourcentage plus élevé de lésions (caractéristiques et non-caractéristiques), même chez les animaux infectés avec la souche B_{19} . Le pourcentage des lésions est réduit par l'inhibition du système

nerveux central, l'association du blocage du système réticulo-histiocytaire diminuant encore plus leur fréquence.

5. Ces résultats prouvent l'influence coordonnée exercée par les systèmes réticulo-histiocytaire et nerveux central, sur les modifications des réactions de l'immunité dans l'infection brucellique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bonciu C. et Popesco Ana. — Bul. Ştiinţific. Acad. R.P.R., 1952, **4**, 295.
2. Bonciu C., Clecner Bia et Mărgineanu A. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 63.
3. Braude A. I. — J. Inf. Dis., 1951, **89**, 87.
4. Dimitriu Ofelia, Vasilesco Th. et Cerbu Al. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**. 122
5. Dimitriu O., Vasilesco Th. et Cerbu Al. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie 1959, **18**. 447
6. Kelly E. H. — J. Inf. Dis., 1953, **93**, 187.
7. Versilova P. A. et Kokorin I. N. — Jurn. Mikrobiol., Epidemiol. i. Immunolog., 1954, No 1, 27; 1954, No 10, 38.
8. Zdrodovski P. — Rev. d'Immunol. et de Thérap. microb., 1957, **21**, 341.

МЕХАНИЗМ ИММУНИТЕТА ПРИ БРУЦЕЛЛЕЗЕ

III. ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У МОРСКИХ СВИНОК ЗАРАЖЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО И ПОДВЕРГНУТЫХ ВЛИЯНИЮ ФАКТОРА, ИЗМЕНЯЮЩЕГО ИММУНИТЕТ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы изучают гистологические изменения у экспериментально зараженных морских свинок, в связи с вирулентностью вводимого штамма, с предварительной вакцинацией животных, с полноценностью или с блокадой ретикуло-гистиоцитарной системы и с изменениями состояния нервной системы (возбуждение и торможение).

Встречаемые изменения разделялись в поражения, характерные для бруцеллезной инфекции — бруцеллезная гранулома — и нехарактерные поражения.

Введение вакцинального штамма нормальным морским свинкам не вызвало характерных поражений, за то штаммы $BrAbS_6$ и BrAbV. вызывают такие поражения в высоком проценте случаев; эффект предварительной вакцинации морских свинок высказался в уменьшении данного процента.

Блокада ретикуло-гистиоцитарной системы снизила процент всех гистопатологических изменений, тормозя реактивность данной системы.

Состояние возбуждения центральной нервной системы увеличило также и реактивность ретикуло гистиоцитарной системы, вызывая резко вышенный процент изменений (характерных и нехарактерных) по сравнении с контрольными свинками; такой результат получился также и с штаммом B_{19}.

Состояние торможения Ц.Н.С. снизило реактивность ретикуло- гистиоцитарной системы, обуславливая меньший процент поражений; прибавление блокады снизило еще больше данный процент.

DER IMMUNITÄTSMECHANISMUS IN DER BRUZELLOSE

III. HISTOPATHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN BEI EXPERIMENTELL INFIZIERTEN UND DEM EINFLUSS EINES IMMUNITÄTSABÄNDERNDEN FAKTORS AUSGESETZTEN MEERSCHWEINCHEN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser studieren die histopathologischen Veränderungen bei experimentell infizierten Meerschweinchen, im Zusammenhang mit der Virulenz des eingeimpften Stammes, der vorausgehenden Schutzimpfung der Tiere, dem Zustand der Integrität oder der Blockierung des Retikulohistiozytärensystems und den Änderungen im Zustand des zentralen Nervensystems (Erregung und Hemmung).

Die vorgefundenen Schäden wurden in für die Brucellainfektion (charakteristische) und in uncharakteristische eingeteilt.

Der Schutzimpfstamm rief bei normalen Meerschweinchen keine charakteristischen Schäden hervor, während die Stämme *Br. ab.* S_6 und *Br. ab.* V derartige Schäden in einem hohen Prozentsatz von Fällen hervorrufen. Vorausgehende Schutzimpfung der Meerschweinchen führt zu einer Herabsetzung dieses Prozentsatzes.

Blockierung des RHS verringerte, durch Hemmung der Reaktionsfähigkeit dieses Systems, den Prozentsatz aller histopathologischen Läsionen.

Der Erregungszustand des ZNS erhöhte auch die Reaktionsfähigkeit des RHS, so dass bei solchen Tieren ein viel höherer Prozentsatz charakteristischer und uncharakteristischer Läsionen zu verzeichnen war, als bei Kontrolltieren. Das gleiche Ergebnis wurde auch im Falle des Stammes B_{19} erhalten.

Der Hemmungszustand des ZNS verringerte die Reaktionsfähigkeit des RHS, wobei der Prozentsatz der Schäden abfiel. Zusätzliche Blockierung verursacht einen noch stärkeren Abfall dieses Prozentsatzes.

THE MECHANISM OF IMMUNITY IN BRUCELLOSIS

III. HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTALLY INFECTED GUINEA-PIGS SUBJECTED TO THE INFLUENCE OF AN IMMUNITY-MODIFYING FACTOR

SUMMARY

The authors study the histopathological changes occurring in experimentally infected guinea-pigs, in relation to the virulence of the inoculated strain, to previous immunization of the animals, to the condition of integrity or blocking of the reticulohistiocytic system, and to changes in the status of the central nervous system (excitation and inhibition).

The lesions encountered were classified as characteristic for brucellosis — brucellous granuloma — or as uncharacteristic lesions.

The vaccinal strain, when inoculated in normal guinea-pigs, did not cause characteristic lesions, while strains *Br. ab.* S_6 and *Br. ab.* V caused such lesions in a high percentage of cases. Previous immunization of the guinea-pigs resulted in a decreased incidence rate of lesions.

Blocking of the RHS decreased the incidence rate of all histopathological lesions by inhibiting the reactivity of this system.

Excitation of the CNS led to increased reactivity of the RHS as well, the incidence rate of (characteristic and uncharacteristic) lesions being considerably higher in such animals than in controls. This effect was observed to occur in the case of the B_{19} strains as well.

Inhibition of the SNS decreased the reactivity of the RHS, the incidence rate of lesions being lower. Association of blocking further lowers this incidence rate.

ONSIDÉRATIONS SUR LA VALEUR DE L'ASSOCIATION DE LA YSOGÉNÉITÉ DE *S. TYPHI* À LA LYSOTYPIE DIRECTE DANS L'ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

par

V. Rusu, Cornelia Combiesco, Marcela Nicolesco, Sanda Ţupa, I. R. Vlădoianu et Thea Horodniceanu

en collaboration avec:

. Totesco, I. Soiu, Valeria Henţiu, S. Muscan, Margareta Vancea, V. Companeţ, Ilse Hügel, Colette Georgesco, Rezeda Nemeş et Doina Cristian

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de la Fièvre Typhoïde, Epidémiologie et iagnostic Bactériologique « Colentina », en collaboration avec la Station Anti-Epidémique de la région Staline)

— Manuscrit reçu le 2 juillet 1959 —

La lysotypie de S. typhi présente un grand intérêt pour les investigations pidémiologiques, tant sur plan mondial, que sur plan régional. Il existe ujourd'hui une évidence de la répartition des divers lysotypes, dont une artie sont cantonnés dans les diverses zones du globe, tandis que d'autres nt un caractère ubiquitaire (16). Cette méthode est devenue indispensable our les enquêtes effectuées dans les foyers, ainsi que dans le dépistage t évidence des porteurs de S. typhi.

En Roumanie, d'après les données communiquées par le Centre National e Phages-Références (4, 5, 6, 7, 8, 9), les types le plus fréquemment ren-ontrés pendant les années 1950—1956, sont, par ordre décroissant: A, E_1, F_1, $)_1$, le type E_1 dépassant le type A, à partir de 1956. Pendant cette même ériode, le pourcentage des souches Vi négatives a été de 6,9%, celui des souches 'i dégradées ou hétérosensibles (atypiques) de 9,94% et celui des souches on-typables, résistantes aux phages spécifiques, a augmenté de 12,9% à 20,45%.

Il y a cependant des zones, où l'efficience de la lysotypie est fortement ntravée par la présence presque exclusive des souches non-déterminables, Vi égradées et Vi négatives. Dans une telle zone — une localité considérée comme plus contaminée de fièvre typhoïde du pays — 86,4% des souches isolées chez s malades déclarés dans l'intervalle 1949—1955, appartenaient aux catégories is-mentionnées.

D'autre part, les souches isolées des porteurs identifiés dans cette localité, rs d'une étude épidémiologique complexe (18) et testées immédiatement après isolement vis-à-vis de la série de 45 phages Vi de type, ont été réparties mme suit:

on déterminables	87	53,7%;
ype A	2	1,2%;
ype A dégradé	4	2,5%;
i dégradées (atypiques)	21	13,0%;
ormes W	15	9,2%;
roupe D (type non précisé)	33	20,4%;
otal	162	100%;

Cet aspect constitue un exemple typique de l'inefficacité de la lysotypie. Le seul type précisé (type A) représente seulement 1,2%, tandis que les souches sensibles aux phages du groupe D, ne peuvent être considérées comme un type déterminé.

On a également observé — à l'occasion de diverses déterminations — une variabilité marquée des souches, ce qui a contribué, en plus, à diminuer la valeur de cette méthode d'investigation.

Les facteurs limitatifs de la lysotypie, ainsi que l'importance épidémiologique de cette zone, ont déterminé les auteurs à effectuer un examen plus détaillé des souches isolées des porteurs.

Dans ce but, nous avons considéré nécessaire d'étudier la possibilité d'une extension de l'efficience de la lysotypie et de poursuivre, en même temps, le degré de variabilité des souches dans leur comportement envers les phages Vi de type, ainsi que les conditions de l'apparition de ces variantes. Nous avons tâché d'augmenter l'efficacité de la lysotypie par l'utilisation de:

— phages additionnels de type;

— phages non-adaptés;

— la détermination du type biochimique, dans le cadre des types bactériophagiques.

— l'étude du caractère lysogène, par: détermination du spectre lytique des phages tempérés; détermination de la capacité de lysogénéisation et transformation du type A; étude de la sensibilité ou de l'immunité des souches envers ces phages.

En abordant le côté pratique de l'étude de la lysogénéité, notre point de départ a été celui de vérifier, en premier lieu, en quelle mesure les conditions variées de milieu, pouvant affecter la sensibilité des bacilles typhiques envers les phages Vi de type, respectent le caractère héréditaire lysogène plus stable — éventuellement déterminant de type — et en second lieu, dans quelle mesure les différences entre ces deux caractères, sont vérifiées ou infirmées par la situation épidémiologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les 162 souches étudiées, ont été isolées du même nombre de porteurs, identifiés en dehors de toute manifestation épidémique, ensuite conservées sur milieu Dorset et sur gélose 1%, à + 4° C.

La lysotypie a été effectuée d'après la technique classique, utilisant des préparations phagiques standardisées du Laboratoire Central de Bactériophages Entériques, Colindale — Londres. Dans la première étape, nous disposions d'un « set » de 45 phages Vi de type (A — 37), qui, par la suite a été complété par 11 préparations (C_6, C_7, C_8, C_9, D_7, D_8, 38, 39, 40, 41 et 42). Les souches non-typables à la première détermination, ont été testées de nouveau, après purification.

Les souches type A et Vi dégradées, ont été examinées également vis-à-vis de préparations de phages Vi non adaptés I, III, IV, V, VI, VII, ainsi qu'envers le phage A × 20 dilution test.

Le comportement biochimique a été contrôlé envers le xylose et l-arabinose, durant 30 jours.

La stabilité du comportement phagique a été poursuivie «in vivo» et «in vitro»:

— « in vivo », par isolement répété des souches ou par contrôle de multiples colonies, isolées de la même récolte.

— « in vitro », par le test à divers intervalles de la même souche, maintenue sur le milieu Dorset.

On a effectué en tout, 930 lysotypies, ce qui représente environ 6 déterminations par souche.

La lysogénéité a été contrôlée d'après la technique décrite par ANDERSON et FELIX, par des enrichissements, utilisant comme substratum la souche type A standard.

L'activité lytique des préparations obtenues a été testée vis-à-vis des souches indicatrices S. typhi type A et S. typhi forme W.

Pour obtenir des phages à titre élevé, on a ensemencé en 20 ml bouillon Hottinger 200 millions bacilles typhiques type A, culture de 3 heures et 1 ml de la préparation à multiplier; incubation 8 heures à 38,5°, conservation au frigidaire pendant la nuit; après centrifugation, le surnageant, traité avec du phénol 0,4% ,inactivé à 58°, pendant 40 minutes, ou laissé comme tel, est titré vis-à-vis de la souche S. typhi type A.

Le spectre de chaque phage tempéré a été déterminé envers: 56 souches test Vi de S. typhi, une souche S. typhi forme W, ainsi qu'envers les espèces d'Entérobactériacées suivantes: S. paratyphi A_6H, S. paratyphi B_{62}, S. london, S. paratyphi C, S. montevideo, S. gallinarum, Sh. Shigae 10702, Sh. schmitzi, Sh. flexneri, Sh. sonnei, « S », Sh. sonnei « R », E. ballerup et E. coli « Brx. ».

La capacité de lysogénéisation et transformation de la souche type A, a été étudiée, tant sur milieu solide qu'en bouillon. Dans le premier cas, la culture résistante de S. typhi type A, obtenue sur gélose, a été passée sur bouillon. Dans le second cas, on a ensemencé directement en 20 ml bouillon Hottinger 200 ml S. typhi type A, dans la phase de croissance logarithmique et 1 ml phage tempéré concentré. Après incubation de 16 heures à 38,5°, des dispersions ont été faites sur plaques de gélose, suivies par les repiquages des colonies développées, en vue du test pour les phages Vi de type.

RÉSULTATS

A. *Lysotypie extensive.*

1. *Pour le groupe des souches non-déterminables*, la lysotypie extensive a permis l'identification du type 38, dans 84 cas sur 87 (96,5%); les autres trois souches y sont maintenues non-déterminables.

Du point de vue épidémiologique, la scision du groupe non-déterminable par l'identification du type 38 a été utile, dans le sens qu'elle a séparé un type précis; cependant, le fait que ce type ait été rencontré dans une proportion de 4,9% du total des souches, marque une certaine uniformité de l'incidence des lysotypes dans cette région, empêchant la lysotypie de donner son maximum d'efficacité.

Selon les données communiquées par M. CIUCĂ et coll. (8), le type 38, représentant — pour le pays entier — 44% du total des souches non-déterminables, est rencontré aussi bien comme type épidémiologique, que sporadique; dans la localité contrôlée par nous, ce type se montre prévalent.

2. *Pour les souches du groupe D*, la lysotypie extensive n'a pas permis de préciser un lysotype déterminé, offrant toutefois, des indications supplémentaires quant à la lysotypie limitée; ainsi, toutes les souches — indépendamment du degré de sensibilité envers les phages D_1—D_6—ont présenté une lyse marquée vis-à-vis des phages additionnels D_7 et D_8.

Des 33 souches groupe D, sept se sont comportées comme les D_1 dégradées (D_1 = SCL; D_2 = 3 +; D_4 = SCL; D_5 = +; D_6 = ±; D_7 = SCL; D_8 =

3 +); du reste de 26 souches, 15 ont montré une sensibilité marquée et constante envers le phage D_4 et une lyse très nette envers D_7 et D_8, alors que 11 d'entre elles présentaient des variantes sensibles seulement vis-à-vis de D_7 et D_8. Pour ces dernières souches, le diagnostic provisoire de lysotype D_7 n'a pas été confirmé par l'I.C.E.P.T.

A part cela, les souches groupe D, ont été testées aussi envers le phage 1137, identifié par SECHTER (20); cette préparation, propcsée provisoirement comme phage de type D_9, donne: une lyse complète avec les souches A, D_1 et la souche homologue, une lyse marquée avec D_5 et minime avec B_2 et B_3. Ce phage a donné une lyse intense avec les 33 souches du groupe D.

Toutefois, les souches provenant de ce foyer, se comportent différemment vis-à-vis du schéma indiqué comme standard pour la souche 1137 (D_9), par la lyse accentuée — SCL ou 3 + — par le phage D_8, ainsi que par l'absence totale de sensibilité envers le phage E_4.

Tenant compte des différences signalées ci-dessus, et du fait que le type D_9 ne soit pas encore confirmé, ces souches continuent à être considérées comme appartenant au groupe D, de type non-précisé.

La lysotypie extensive à l'aide de phages additionnels de type a facilité l'éclaircissement de 51,9% des souches, identifiées comme type 38. Elle a permis, en même temps, d'obtenir des informations supplémentaires sur les souches du groupe D, surtout en ce qui concerne les 11 variantes, sensibles uniquement aux phages D_7 et D_8 qui, dans le cas de la lysotypie limitée, auraient été incluses dans le groupe des souches non-déterminables.

B. *Variabilité des souches de type 38 et groupe D.*

Les souches type 38, ont présenté un haut degré de variabilité, quant à leur sensibilité envers les phages Vi de type, tant « in vivo » que « in vitro »; c'est pourquoi l'identification de ce type a nécessité de nombreux examens: récoltes et cultures répétées du même porteur, contrôle de multiples colonies.

On a étudié 80 sur 84 souches, du point de vue des variantes apparues « in vivo » et « in vitro ». Les variantes rencontrées, ainsi que leur fréquence, sont présentées dans le tableau I.

Tableau I

Variantes du lysotype 38 et leurs conditions d'apparition

Type de la variante	Conditions d'apparition	Numéro d'ordre des souches à variantes	Nombre total
Non-déterminable	« in vivo »	481; 482; 675; 2389; 3040; 3232; 3483; 5086; 5902;	9
	« in vitro »	1322; 3040; 3232; 6208; 6366; 6608;	6
Atypique (Vi dégradé)	« in vivo »	456; 481; 728; 1322; 3378; 5902; 6366;	7
	« in vitro »	629; 675; 1322; 6012; 6366; 6555;	6
A dégradé	« in vivo »	629; 3232; 3250; 3927; 5086; 5148;	6
	« in vitro »	—	—
Vi négatif	« in vivo »	629; 1490; 2389; 3040;	4
	« in vitro »	675; 1322; 2821; 3040; 3232; 5148; 6555;	7

De la synthèse des données de ce tableau, se détachent les constatations uivantes:

1. Les variantes du lysotype 38, se manifestent de diverses manières:

— réduction ou disparition de l'aire réceptrice spécifique (vers le non-éterminable).

— élargissement de cette aire aux phages hétérologues (vers l'atypique, dégradée).

— perte de l'antigène Vi (forme W).

2. A l'exception des variantes A dégradées, apparaissant seulement « in ivo », tous les autres types de variantes ont été rencontrés dans les deux cas.

3. Une même souche peut présenter une seule ou plusieurs variantes, otamment:

a) Douze souches présentant une seule espèce de variante, dont:
- non-déterminables .....4 souches (482,3483,6284,6608);
- atypiques.....4 souches (456,728,3379,6012);
- A dégradées .....2 souches (3250,3927);
- W .....2 souches (1490,2821);

b) Huit souches présentant deux espèces de variantes:
- non-déterminables et atypiques .....3 souches (481,5902,6366);
- non-déterminables et W .....2 souches (2389,3040);
- atypiques et W .....1 souche (6555);
- non-déterminables et A dégradées.....1 souche (5086);
- A dégradées et W.....1 souche (5148);

c) Quatre souches présentant trois espèces de variantes:
- non-déterminables, W et atypiques .....2 souches (675,1322);
- non-déterminables, W et A dégradées .....1 souche (3232);
- atypiques, A dégradées et W .....1 souche (629);

4. Vingt-quatre des 80 souches (30%) ont présenté des variantes, indépen-amment de leur aspect et nombre.

Les données sus-mentionnées, faisant ressortir l'instabilité relative du pe 38, attirent l'attention sur la possibilité de rencontrer fréquemment des ariantes de ce lysotype, dans les zones où celui-ci prévaut.

Pour les souches groupe D, le degré de variation a été d'intensité diverse; rtaines d'entre elles présentant des variantes dont la sensibilité était modifiée niquement envers les phages Vi du groupe D, alors que la sensibilité des utres l'était aussi envers les phages hétérologues. Un degré limité de variation été rencontré chez 7 souches, originellement D_1 dégradées, présentant « in vo » et « in vitro » des variantes seulement pour D_4, D_7 et D_8 (1241, 7297, 404, 3492, 1359, 1489, 2293); de même, du reste de 26 souches, 11 avaient ndance à perdre la sensibilité pour le phage D_4, ne gardant que celle vers les phages D_7 et D_8.

La sensibilité acquise envers les phages de type en dehors du groupe D tendance à l'atypie — a été rencontrée chez 6 souches; chez 4 d'entre les (3524, 1220, 667, 1062) les variations étaient constatées « in vivo » et chez eux (528,3541) « in vitro »; deux souches groupe D (1062, 3524), à variantes ypiques, ont présenté en plus, « in vitro », des variantes W.

En conclusion, les souches groupe D présentent également un certain degré hétérogénéité; chez 18 des 33 souches (54,56%), les variantes se limitent groupe D (types non-précisés), alors que l'on n'a observé que dans 6 cas

(18,2%) des souches dont la sensibilité s'étendait aussi aux phages de type, en dehors du groupe D (atypiques); de ce point de vue, les souches groupe D, paraissent être plus stables que le lysotype 38.

Des modifications concernant le comportement envers les phages Vi de type, apparues dans des conditions naturelles (pendant la maladie, ou après installation de l'état de porteur), ont fait l'objet de plusieurs recherches en Roumanie. Ainsi, NESTORESCO et coll. (15) observent l'apparition de formes W chez les souches sensibles aux phages Vi (A, C, F_1, D_1, atypiques), vers la fin de la maladie ou pendant la convalescence. CORNELSON et coll. (10), constatent des modifications du comportement envers les phages Vi — durant les différentes phases de la maladie et pendant la convalescence — dans 12,8% et C. COMBIESCO (1) dans 23,96% des cas.

Nous citons les cas décrits dans la littérature étrangère, par HENDERSON et FERGUSON (13), JUDE et coll. (14), WIZA (21) et DRYL (11). Toutefois, la majorité de ces auteurs considèrent la fréquence de pareilles variantes comme exceptionnelle.

Pour les souches étudiées — type 38 et groupe D —, on a constaté des modifications du comportement envers les phages Vi de type dans 42,5% des cas (sur 48 de 113 souches étudiées). Cette fréquence est cependant, trop marquée chez les souches isolées des porteurs pour que l'apparition de variantes puisse être considérée comme exceptionnelle.

C. *Sensibilité envers les phages non-adaptés I, III, IV, V, VI, VII et A* × 20

Le test envers les phages non-adaptés a été effectué, pour toutes les souches de type A, A dégradées et atypiques, ainsi que pour 16 variantes atypiques ou A dégradées, provenant des souches type 38 ou groupe D, de type non-précisé. Le comportement envers les phages non-adaptés et phage A × 20, des souches appartenant aux groupes mentionnés et de leurs variantes, est inscrit dans le tableau II.

Tableau II

Comportement des souches type A, A dégradées et atypiques (originales ou variantes) envers les phages non-adaptés

Groupe	Sous-groupe	Sensibilité envers les phages: AX$_{20}$	I	III	IV	V	VI	VII	Lysotype	souche: originale	variante: Groupe D	variante: Type 38	Nombre total	Le spectre envers les phages de type
I	1	+	+	+	+	+	+	+	A	2	—	—	2	spectre large
									A dégradé	2	2	2	6	» »
									atypique	5	3	4	12	» »
	2	+	+	+	+	−	−	−	A dégradé	2	—	1	3	spectre large
									atypique	4	—	2	6	» »
II		—	+	+	+	+	+	—	atypique	12	—	2	14	spectre limité

Légende: + = sensible
— = résistant.

De ce tableau résultent les faits suivants:

1. Les souches, présentant une large sensibilité pour les phages, qui sont ssées également par A × 20, peuvent être considérées comme véritables souches i dégradées; les souches à spectre très limité, résistantes au phage A × 20, e pourraient être incluses dans la catégorie sus-mentionnée.

2. Dans le groupe des souches A × 20 sensibles, on distingue deux sous-roupes:

a) le premier comprenant les souches sensibles à tous les phages non-daptés;

b) le second contenant les souches résistantes aux phages V, VI et VII.

3. Les souches type A, se trouvent dans le premier sous-groupe, tandis ue les souches A dégradées et atypiques, à spectre large, figurent dans les eux sous-groupes; ce fait est valable, tant pour les souches d'origine — aty-iques ou A dégradées — que pour les variantes. On observe cependant, que s variantes provenant du type d'origine 38, se trouvent dans les deux sous-roupes, alors que celles du groupe D appartenaient seulement au pre-ier groupe. Les degrés d'atypie des souches appartenant aux deux sous-roupes A × 20 sensibles, sont presque pareils.

Il n'a pas été possible de saisir la signification épidémiologique des diffé-nces entre les deux sous-groupes, qui, selon toute probabilité, n'existent seule-ent pas. Dans ce sens, nous mentionnons l'exemple de la souche 456, type 8 d'origine, présentant des variantes I, III, IV, V, VI, VII et A × 20 = CL, ussi bien que des variantes I, III, IV, A × 20 = CL et V, VI, VII = négatives. a même souche présente également des variantes I, III, IV, V, VI = CL et II, A × 20 = négatives.

D. *Le type biochimique.*

Toutes les souches ont attaqué promptement le xylose (24 heures), alors ue l'action envers le l-arabinose a varié. Ainsi, du total de 162 souches, 152 (2,6%) n'ont pas fermenté le l-arabinose, dans un délai de 30 jours; par consé-uent, elles peuvent être considérées comme type I fermentatif; les autres 10 (,4%) ont présenté, au cours des diverses déterminations, aussi des variantes l-arabinose positives.

Il faut remarquer que dans ces cas, la scision du l-arabinose est survenue nviron après 12,1 jour (48 heures—24 jours); aucune des souches n'ayant attaqué l l-arabinose, les premières 24 heures.

Il est donc probable que certaines souches de cette zone sont susceptibles acquérir, avec le temps, un équipement enzymatique pour le l-arabinose. e fait que des souches l-arabinose positives soient apparues tardivement, dans ne population microbienne à éléments l-arabinose-négatifs, nous détermine les considérer comme variantes fermentatives et non comme souches de pe biochimique III, à caractère fermentatif primaire, lent.

Les variantes fermentatives ont été rencontrées, en fonction du lysotype, ns la proportion suivante:

Lysotype	Nombre total	fréquence des variantes fermentatives
38	84	1
A	2	1
A dégradé	4	1
atypique	21	3
W	15	2

De semblables variantes ont été également rencontrées chez deux souches du groupe D, type non-précisé, à tendance vers l'atypie et perte de l'antigène Vi; on n'a pas constaté de variantes fermentatives l-arabinose-positives, chez les souches stables groupe D.

Le fait que de telles variantes fermentatives l-arabinose positives, soient apparues chez des souches à lysotype précisé, ainsi que chez des variantes provenant du type 38 ou groupe D, ne nous permet point de leur accorder une importance épidémiologique, bien qu'elles aient été le plus souvent rencontrées chez les souches avec tendance à la dégradation.

E. *Lysogénéité.*

Le caractère lysogène a été étudié sur 161 souches, dont 133 ont été testées une seule fois, 16 deux fois et 12, trois fois.

Dans nos conditions de travail, le stade lysogène a été constaté chez 32 de 161 souches testées (19,9%), et pour le total des examens, chez 40 (20,1%). Toutes les préparations phagiques ont été invariablement isolées par les trois méthodes utilisées.

Le titre des phages a oscillé, immédiatement après l'isolement, entre 10^{-2} — 10^{-3}, à l'exception d'un seul, qui avait présenté au début, un titre élevé 10^{-7}; après multiplication, utilisant comme substratum la souche S. typhi type A on a élevé le titre de ces phages jusqu'à 10^{-5}, 10^{-6}.

Le spectre des phages, amenés à des titres très proches, déterminé pour les souches de S. typhi Vi test, de S. typhi forme W et autres Salmonella et espèces d'Entérobactériacées, est présenté dans le tableau III.

De ce tableau il résulte que tous les phages tempérés, à l'exception du phage 73, ont présenté un spectre d'activité uniforme, pouvant être considéré identique à celui du phage tempéré, extrait de la souche type D_1, en dehors du comportement envers S. paratyphi C. Tous les phages latents, en dehors du 73, ont été actifs pour S. typhi forme W, mais aucune des autres Salmonella ou autres espèces d'Entérobactériacées ne se sont montrées sensibles pour les phages tempérés.

Les phages à spectre identique à celui de d_1 se sont montrés comme déterminants de type; par la lysogénéisation de souche de type A- d'après la technique en milieu liquide — cette dernière a été transformée en type D_1, lysogène et stable. Dans nos conditions de travail, nous avons réussi à obtenir des modifications de type par la technique en milieu solide, lorsque nous avons utilisé des phages tempérés avec le spectre mentionné.

Les souches type A, lysogénéisées avec l'un des phages tempérés et transformées en souches D_1, sont devenues résistantes aux autres phages tempérés avec le spectre d_1.

Le phage 73, isolé d'une souche W, présente un spectre large, très différent de celui des autres phages. Il agit sur la majorité des souches S. typhi type standard, à l'exception de C_3, E_2, I, N, 27 mais il n'agit ni sur S. typhi forme W, ni sur d'autres types de Salmonella ou espèces d'Entérobactériacées; il transforme la souche type A, en souche W, tant sur milieu solide, qu'en milieu liquide. (phage V_i).

Le caractère lysogène, en fonction du lysotype et de la sensibilité ou la résistance envers les phages tempérés, sont exposés dans le tableau IV.

Tableau III

pectre des phages tempérés élibérés par les souches groupe D, souche 73 et souche type D_1 standard

Souche test	Phages élibérés par les souches			Souche test	Phages élibérés par les souches			souche test	Phages élibérés par les souches		
	Groupe D*	73**	D_1		Groupe D*	73	D_1		Groupe D*	73	D_1
	+++	+++	+++	E_4	++	+++	+++	32	±	+++	—
1	++ (+)	+++	+++	E_5	±	+++	+	34	++	++	++
2	—	+++	—	E_6	±	+++	—	35	+ (+)	+++	++
3	—	+++	—	E_7	—	+	—	36	+ (+)	±	+
1	—	++	—	E_8	+++	++	+++	37	++	+++	++
2	+	+	+ (+)	E_9	±	+	+	38	++	+++	++
3	+	—	++	F_1	—	+++	—	39	—	+++	+
4	+	+ (+)	+	F_2	—	+++	—	40	+	+++	+
5	+	++	+	G	+ (+)	++	+	41	++	+++	+ (+)
6	++	++	+	H	—	++	—	42	(+)	+++	(+)
7	+	++	+ (+)	J	—	—	—	T.W.	++	—	+ (+)
8	++	++	+	K	—	+++	—	A6H	—	—	—
9	—	++	—	L_1	—	+++	—	B62	—	—	—
1	—	+++	—	L_2	—	+++	—	S. London	—	—	—
2	—	+	—	M	—	+++	—	S. para C	—	—	±
4	—	+++	—	N	—	—	—	S. Montevideo	—	—	—
5	++	+++	+++	O	+++	+++	+++	S. Gallinarum	—	—	—
6	++	+++	+++	T	++	+++	+++	Sh. Shigae	—	—	—
7	—	+++	—	25	+	++	+++	Sh. F12a	—	—	—
8	—	+++	—	26	++	+++	+++	Sh. Sonne S	—	—	—
1	++	++	+++	27	—	—	—	Sh. Sonne R	—	—	—
2	++	—	+++	28	—	++	—	E. ballerup	—	—	—
3	++	+++	+++	29	++ (+)	+++	+++	E. coli Brx.	—	—	—
137	—	+++	—								

*) *Souches groupe D lysogènes :* 3404; 3492; 3524; 3541; 655; 667; 1141; 1062; 1220; 1359; 3240; 82; 1343; 337; 1489; 3533; 409; 509; 1859; 2293; 5038; 6502; 6713; 6864;7477; 7723; 7842; 1118; 3406; 90; 7297.

Légende: +++=lyse confluente; ++(+) — ++= lyse semi-confluente ou d'intensité 3+; +(+)—+= lyse intensité 2+ — 1+; (+)—±= lyse d'intensité ±.

**) = souches forme W.

Tableau IV

ysogénéité et sensibilité ou résistance envers les phages tempérés des souches isolées des porteurs, en fonction du lysotype

Lysotype	Nombre souches testées	Caractéristique des souches						Observations
		lysogènes		résistantes		sensibles		
		No.	%	No.	%	No.	%	
38	83	—	—	—	—	83	100	
A	2	—	—	—	—	2	100	
dégradé	4	—	—	1*	25	3	75	* non-lysogène
ypique	21	—	—	—	—	21	100	
on-déterminable	3	—	—	—	—	3	100	
roupe D	33	31	93,9	33**	100	—	—	** 31 lysogènes et 2 non-lysogènes
W	15	1***	6,6	5****	33,3	10	66,6	*** souche 73 **** non-lysogènes

Ce tableau montre que — dans nos conditions de travail — on n'a réussi à isoler des phages tempérés d'aucune des souches type 38, type A, souches A dégradées et atypiques; dans la catégorie des souches W, une seule s'est montrée lysogène, mais le phage isolé présente un spectre différent de celui des autres. Du total, de 33 souches groupe D, on a pu isoler des phages tempérés de 31 d'entre elles.

Les souches type 38, type A, atypiques — non lysogènes — sont sensibles aux phages tempérés; la résistance au phage d_1 a été rencontrée chez l'une des quatre souches A dégradées, chez cinq des 15 formes W et chez toutes les souches du groupe D, inclusivement les deux non-lysogènes.

E'. *Indications épidémiologiques obtenues par l'étude de la lysogénéité.*

La sous-division des espèces, basée sur les phages tempérés et sur l'immunité ou réceptivité de la cellule bactérienne vis-à-vis de ces derniers, a été introduite dans la pratique épidémiologique, dans les infections avec S. typhi murium, staphylocoques, etc. SCHOLTENS (19), l'a appliquée à S. paratyphi B, comme adjuvant de la lysotypie directe.

La lysogénéité associée à la lysotypie de S. typhi, a été utilisée par HENDERSON et FERGUSON (13), qui arrivent à la conclusion que les souches D_1 et D_4 HP56, isolées du même porteur, les deux lysogènes, portant le même phage tempéré, sont identiques. ANDERSON et FELIX (2), infirment ce diagnostic, soutenant que la souche D_4 HP56, serait une souche type D_4 et considèrent l'emploi des phages naturels, pour le typage de S. typhi, comme non-indiqué.

Il existe évidemment, une série de motifs qui limitent l'application de la lysogénéité dans la lysotypie de S. typhi, dont le plus important est celui que nombre de souches portant le même phage tempéré ou des phages tempérés très rapprochés — donc immuns envers ces derniers — peuvent être considérés comme types différents, vu la lysotypie avec le phage Vi spécifique de type.

Néanmoins, devant le problème épidémiologique étudié par nous, caractérisé par une fréquence relativement élevée des souches de type non-précisé (groupe D, atypiques, forme W) et de leurs variantes, l'étude de la lysogénéité, nous paraissant indiquée, a été appliquée, en vue de:

— dépister le lysotype précurseur chez les souches de type non-précisé;

— dépister les infections mixtes.

Dans ce sens, nous avons poursuivi, tant les indications concernant la présence ou absence du stade lysogène, que celles fournies par le stade immun ou sensible des souches envers les phages tempérés.

1. *L'étude de la lysogénéité* a été utile pour les souches groupe D, type non-déterminé. De ce goupe, 31 souches à sensibilité inconstante aux phages de type, ne pouvant être incluses dans un certain lysotype, élibèrent des phages tempérés, identiques avec le même spectre d'action lytique envers les souches testées. Chaque souche lysogène est immune envers le phage qu'elle élimine, ainsi qu'envers les phages éliminés et portés par le reste des souches de ce groupe. Les phages tempérés de ces souches exercent sur la S.typhi A une action constante de lysogénéisation et transformation en type D_1, ces souches D_1 étant artificielles sont résistantes à tous les phages tempérés, avec le spectre du phage d_1.

De plus, les données épidémiologiques — homogénéité du foyer et relations épidémiologiques positives — sont des arguments en plus en faveur de l'unité de ces souches; par conséquent, les informations épidémiologiques, corroborées avec l'étude de la lysogénéité, nous font conclure que les 31 souches— indifféremment des variations de sensibilité aux phages Vi de type — sont toutes identiques.

2. *L'immunité envers les phages tempérés*, non-associée au cycle productif e ces phages, a donné des indications utiles, dans les cas suivants:
— pour deux souches groupe D,
— pour cinq souches forme W.

La même constatation a été faite pour une souche A dégradée, sensible aux hages non-adaptés et au phage Ax20. Avec certaines réserves, qui seront discutées lus loin, ces souches — en vertu de leur immunité envers les phages tempérés — euvent être considérées au moins comme apparentées entre elles; les données pidémiologiques présument même leur unité.

3. *La sensibilité aux phages tempérés* peut servir comme moyen d'orientation ans le cas de 10 souches, forme W et 3 souches non-déterminables. L'hypo-hèse selon laquelle ces souches ne dériveraient pas des souches groupe D-sogènes ou non, mais immunes aux phages tempérés — peut être prise en consi-ération seulement dans le cas où la perte de l'antigène Vi (transformation en orme W) ou bien la perte de la sensibilité aux phages de type D (transforma-on en forme non-déterminable) n'auraient pas été causées par la perte du caractère sogène et de l'immunité envers les phages tempérés. Cette hypothèse paraît robable, ainsi qu'il sera constaté au chapitre «Discussion».

Par contre, pour le groupe des souches atypiques, ce raisonnement ne eut être pris en considération, vu que l'hétéro-sensibilité des variantes atypiques es souches d'origine du groupe D a été chaque fois accompagnée de la perte u caractère lysogène et de l'immunité. Par conséquent, pour les souches consi-érées invariablement atypiques, nous ne pouvons exclure — en regard de la nsibilité aux phages tempérés — l'appartenance initiale au groupe D, tout n admettant l'éventualité que la souche «précurseur» soit de lysotype 38.

Le double stade de lysogénie et sensibilité simultanées envers son propre hage, a été constaté dans les cultures provenant de deux porteurs (No. 1490 et o. 1062). Comme il ne s'agissait pas de phages très virulents, capables de incre l'immunité de la cellule, nous avons présumé l'existence concomitante souches lysogènes et résistantes et de souches sensibles. Par le contrôle répété es porteurs et en testant de nombreuses colonies, il nous a été possible de ettre en évidence, les types de souches suivants:

Porteur No. 1062 — souches groupe D, lysogènes et résistantes;
— souches forme W, non-lysogènes et sensibles;
— souches forme W, non-lysogènes et résistantes;
— souches type 38, non-lysogènes et sensibles;
— souches atypiques, non-lysogènes et sensibles.

Le porteur No. 1490 a éliminé, en 1956, des souches lysogènes et résistantes, plus de souches non-lysogènes et sensibles, confirmées ultérieurement comme pe 38. En 1957, la culture examinée contenait des souches non-lysogènes et sistantes (souches forme W) alors qu'en 1958, on a isolé à nouveau, des souches sogènes et résistantes (groupe D). Par dispersion, on a mis en évidence: le pe 38, non-lysogène et sensible, des souches forme W, non-lysogènes et résis-ntes, ainsi que des souches groupe D, lysogènes et résistantes. La présence ez ce porteur, de 2 types concomitants, s'explique par la situation épidémio-gique locale, c'est-à-dire par l'existence de deux autres porteurs habitant la ême maison, dont le premier éliminait des souches groupe D (mari de la rteuse) et le second, des souches de type 38 (locataire de cette famille).

Récapitulant les faits sus-mentionnés, il ressort que l'étude de la lysogénie associée à la lysotypie et aux données épidémiologiques, nous a fourni des indications utiles, dans les cas suivants: pour 33 souches groupe D, 5 formes W et une souche A dégradée. Des données informatives ont été obtenues sur 10 souches forme W et 3 souches non-déterminables. Par l'association de l'étude de la lysogénéité, il a été possible de préciser 52 (32,1%) souches.

Une situation générale des souches isolées des porteurs, dressée sur la base des indications fournies par les méthodes utilisées, est rendue dans le tableau V.

Tableau V

Type et fréquence des souches établis selon la méthode utilisée

Méthode	Type provisoire	Type identifié	No.	%
Lysotypie limitée (45 phages Vi de type) . .		A	2	1,2
Lysotypie extensive (56 phages Vi de type) .	non-déterm.	38	84	51,9
Lysogénéité (données sûres)	Groupe D	Groupe D	33	24,1
Lysogénéité (données sûres)	W	Groupe D	5	
Lysogénéité (données sûres)?	A dégradé	Groupe D	1	
Lysogénéité (données d'orientation)	W	38	10	8,0
Lysogénéité (données d'orientation)	non-déterm.	38	3	

En conclusion, des 162 souches isolées, 21 souches atypiques et 3 souches A dégradées sont restées sans indications, ce qui représente 14,8% du total des souches étudiées. Ce taux diffère du taux initial de 98,8% obtenu par l'application de la lysotypie limitée, comme moyen unique d'investigation.

DISCUSSION

L'analyse des résultats du présent travail met en évidence, d'une part, la valeur de la lysotypie extensive par l'emploi des phages additionnels et d'autre part, la déficience de celle-ci par l'apparition de variantes qui changent une des conditions essentielles — la stabilité.

Il y a lieu à supposer que les souches, éliminées par les porteurs de longue durée, risquent — vu les conditions variées de milieu, auxquelles elles sont exposées pendant leur long séjour dans l'organisme — de rencontrer des facteurs de variation et dégradation, comme: les nombreuses espèces de la flore intestinale, en perpetuel état de transformation, à fréquents stades lysogènes et la présence des anticorps homologues, etc. Pendant la maladie, ces facteurs ont une action plus limitée et plus courte.

D'autre part, le spécifique épidémiologique de ce foyer, caractérisé par la contamination massive du milieu ambiant, ainsi que l'échange intense de germes sur le parcours: milieu extérieur — hôte — milieu extérieur, peut expliquer, en partie, l'intervention des facteurs qui provoquent l'apparition des variantes. Ainsi, les souches de S. typhi, fréquemment isolées de l'eau de surface, souterraine, du sol, résidus, mouches, aliments, etc., étaient partiellement lysogènes et accompagnées d'une proportion élevée de phages typhiques (17).

le plus, les conditions précaires d'existence dans le milieu extérieur étaient usceptibles d'influencer, aussi bien les souches dans le sens de leur capacité sogène, que les phages, favorisant l'apparition de souches mutantes virulentes. a présence ou l'absence du stade lysogène, ainsi que la contamination par les hages virulents, représentent des facteurs pouvant déterminer, soit la diminution - jusqu'à la disparition — de «l'aire réceptrice» de la cellule microbienne, soit ne sensibilité accrue envers les phages hétérologues, aussi bien que l'appari- on de formes W.

Comme exemple de corrélation entre le stade lysogène et l'apparition des ariantes, nous citons les résultats obtenus par M. Ciucă (3) avec une des plus nciennes souches lysogènes d'Entérobactériacées. La souche Coli M 1920 1921, btenue par lysogénéisation avec le phage Coli polyvalent, bien que gardant son nité biologique, durant l'intervalle de 400 passages, pendant 36 ans, a présenté n haut degré de dissociation; ainsi, parmi 20 populations microbiennes obtenues es sous-cultures, on a constaté pas moins de 11 variantes, qui diffèrent entre les par l'aspect des colonies et par la présence ou absence du stade lysogène.

Dans nos conditions de travail, on n'a pas réussi à établir une relation entre diminution ou l'extension de la sensibilité aux phages spécifiques et la présence u absence du caractère lysogène chez le lysotype 38. En échange, l'apparition e variantes hétérosensibles à spectre large, sensibles aux phages I, III, IV, , VI, VII et Ax20 chez les souches du groupe D, a été régulièrement accom- agnée de la disparition du stade lysogène et de l'immunité vis-à-vis des phages empérés.

Une partie des souches dépourvues de l'antigène Vi, provenant probablement u groupe D, ont conservé leur capacité d'immunité envers le phage tempéré, ans qu'il soit possible de démontrer un stade productif de phages tempérés.

Le conditionnement réciproque des propriétés lysogènes et la réaction envers s phages Vi de type, constituent d'autre part, et malgré les objections existantes, argument de base quant à l'utilisation de la lysogénéité dans la pratique épidé- iologique, comme adjuvant de la lysotypie. Elle est surtout indiquée dans es situations épidémiologiques similaires à celle étudiée par nous, se caracté- sant par un nombre élevé de porteurs et la présence de souches à réaction non- aractéristique, vis-à-vis des phages Vi, la présence de souches à tendance à la ariation et l'existence des souches forme W, atypiques ou résistantes.

Ainsi, le cas des souches groupe D à tableau phagique varié, aurait u donner lieu à des confusions, en respectant «ad literam» la lysotypie directe. a présence du même phage tempéré déterminant de type pour 31 souches roupe D, immunes au phage respectif, provenues de porteurs avec relations idémiologiques évidentes, nous a permis de considérer ces souches comme type nique, bien que leur comportement envers les phages Vi de type soit variable ême après purification.

Les mêmes relations épidémiologiques, prises en considération pour les ouches groupe D, non-lysogènes, mais immunes envers le phage tempéré, nduisent aux mêmes conclusions.

Par conséquent, l'unité de ces 33 souches groupe D, a été démontrée, par tte voie, bien qu'elles correspondent, pour le moment, à un type déterminé u schéma officiel des lysotypes.

L'appartenance de certaines souches au même groupe D, présumée en rtu de leur immunité envers les phages tempérés et des indications d'ordre idémiologique a été démontrée aussi pour certaines souches forme W. Ainsi,

chez 4 des 5 porteurs, éliminateurs de souches W non-lysogènes, mais résistantes au phage tempéré d_1, on a pu démontrer, par coprocultures répétées et en examinant de nombreuses colonies, la présence, dans le même échantillon, tant des souches W, que des souches possédant l'antigène Vi, sensibles aux phages groupe D. Dans deux de ces 4 cas, on a démontré la présence de souches sensibles aux phages groupe D, en proportion d'environ 1/20, après la seconde coproculture et chez les autres 2 porteurs, après 2 ans d'examens répétés. Dans le cas des souches W, isolées des 5 porteurs, l'absence de sensibilité aux phages tempérés peut être attribuée, avec certitude, à une immunité réelle envers le phage tempéré d_1 et non à une immunité due à d'autres causes.

Vu la particularité du cas, nous ne sommes pas encore à même d'expliquer la signification de la résistance d'une souche A dégradée aux phages tempérés. Toutes les autres souches atypiques se sont montrées sensibles à ces phages, même lorsqu'elles représentaient des variantes de souches à origine lysogènes.

L'interprétation des données, basées sur la sensibilité aux phages tempérés, doit être abordée avec une certaine prudence. La sensibilité des souches atypiques est entièrement dépourvue de signification, étant donné que les variantes atypiques provenant des souches groupe D sont également sensibles aux phages tempérés. L'hypothèse selon laquelle, en vertu de la sensibilité aux phages tempérés, les souches forme W, ne proviendraient pas du groupe D, ne peut être confirmée qu'en partie, c'est-à-dire seulement en cas de non-apparition de formes W sur le trajet: souches groupe D, lysogènes ou non et immunes→souches atypiques, non-lysogènes et sensibles→formes W, non-lysogènes et sensibles. Lors de la présence concomitante de variantes W et atypiques chez 2 souches groupe D, les formes W se sont montrées non-lysogènes, mais résistantes, alors que les variantes atypiques étaient non-lysogènes et sensibles. Ceci nous fait supposer que l'apparition des formes W, par la voie décrite ci-dessus, bien que pas exclue, n'a pas eu lieu.

Il nous incombe donc, d'attribuer aux souches W non-lysogènes et sensibles aux phages tempérés, comme type précurseur, le type 38 qui prédomine dans cette localité; les données épidémiologiques n'excluent pas cette éventualité.

En résumé, dans ce foyer il existe, selon toute probabilité, deux lysotypes originaux: le type 38 et un type non-précisé du groupe D, les autres souches atypiques W, A, A dégradées pouvant être considérées comme dérivant de ces derniers.

Nous avons donc considéré nécessaire, avant d'établir nos conclusions, de faire un sondage sur les relations et inter-dépendance entre ces 2 types. Dans l'absence de phages tempérés, isolés des souches type 38, nous nous sommes limités à poursuivre l'influence des phages tempérés, extraits des souches groupe D, sur le type 38 et ses variantes.

Dans nos conditions de travail, les phages tempérés, capables de transformer la souche type A en souche D_1, se sont montrés indifférents envers les souches type 38 étudiées, ainsi qu'envers la souche type 38 standard, ou bien les ont transformées en souches non-déterminables.

Par lysogénéisation d'une variante de forme A dégradée de la souche 5148 type 38 d'origine, on a, par contre, réussi à obtenir une souche présentant le spectre suivant: $I + IV = CL$; $D_4 = 2+$; $D_7 = SCL$; $D_8 = 2+$; $E_3 - E_5 = +$.

Cet exemple montre que la possibilité de transformation d'un lysotype dans un autre, prouvée par voie artificielle, par divers auteurs (1,2,12,14), serait assurée — dans ce foyer — dans les conditions nécessaires à l'apparition par voie

turelle. Ainsi, la présence de variantes A, A dégradées ou atypiques, provenues
1 type 38, et susceptibles d'être lysogénéisées par les phages isolés des souches
roupe D, constitue des facteurs représentant le support matériel de pareilles
ansformations.

L'importance pratique de ce résultat singulier a déterminé les auteurs à
fectuer une étude à part, concernant l'influence des phages tempérés ou des
hages libres, de provenance diverse (fèces, eau, sol., etc.), isolés dans ce foyer,
r les souches A dégradées ou atypiques — variantes sûres du type 38 prévalent
ns la zone étudiée.

CONCLUSIONS

1. On a étudié, par association de la lysogénéité avec la lysotypie directe, 52 souches, isolées de porteurs dépistés dans la localité la plus infestée de fièvre typhoïde du pays. Ces souches se sont montrées, au moment de leur isolement (1957) non-typables avec la série de 45 phages Vi de type, dans une proportion de 98,8%.

2. A l'aide des phages additionnels, inclus dans le schéma en 1958, on a pu identifier le type 38, dans 51,9% des cas, qui s'est avéré comme type prédominant dans la zone étudiée. Les souches groupe D, ne pouvant être incluses dans un type précis, ont montré une sensibilité marquée aux phages D_7 et D_8.

3. Du total des souches, 42,5% ont présenté des variantes «in vivo» et «in vitro», avec tendance à l'atypie, ainsi que vers les formes non-déterminables et forme W. Cette variabilité accentuée paraît propre aux souches isolées des porteurs et très probablement liée en même temps, au spécifique épidémiologique de cette zone.

4. Par l'étude de la lysogénéité, d'une part, et de la sensibilité ou de l'immunité des souches de ce foyer envers les phages tempérés, d'autre part, il a été possible de dépister le lysotype précurseur de 52 souches (32,1%), dont: 2 à réaction atypique aux phages groupe D, 15 souches forme W,3 souches non-déterminables et 1 souche A dégradée.

Par conséquent, l'association de la lysogénéité à la lysotypie extensive a fourni des indications d'ordre épidémiologique, augmentant le nombre des souches à lysotype déterminé, en partant de 1,2% — obtenu par la lysotypie avec 45 phages, comme unique moyen d'investigation — à 84,2%.

5. Les phages non-adaptés et la détermination du type biochimique, n'ont pas donné — dans ce cas — d'indications complémentaires.

6. Les phages tempérés se sont montrés indifférents envers le type 38, ou l'ont transformé en forme non-déterminable; par contre, une variante A dégradée de ce type, apte à la lysogénéisation, a été transformée en souche groupe D.

7. Les données de ce travail soulignent, en premier lieu, l'opportunité de la lysogénéité comme adjuvant de la lysotypie de S. typhi pour les souches dégradées et démontrent, en second lieu, la possibilité de coexistence de certains facteurs permettant, dans des conditions naturelles, la transformation d'un lysotype dans un autre.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON E. S. — Nature, 1955, **175**, 171
ANDERSON E. S. et FELIX A. — J. Gen. Microbiol., 1953, **9**, 65.
CIUCĂ M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 161.

4. Ciucă M., Combiesco Cornelia, Nestoresco N., Popovici Marcela, Nicolesco Marcela et Petresco D. — Bul. St. Acad. RPR, Sect. St. Med., 1950, **2**, 243.
5. Ciucă M., Combiesco Cornelia, Nestoresco N., Popovici Marcela et Nicolesco Marcela — Bul. St. Acad. RPR, Sect. St. Med., 1950, **2**, 661.
6. Ciucă M. et Combiesco Cornelia — Comm. au colloque pour le bactériophage, 1956, Wernigerode.
7. Ciucă M. Combiesco Cornelia et Meitert T. — Comm. III-e Colloque de lysotypie 1957, Wernigerode.
8. Ciucă M., Combiesco Cornelia, Ţupa Sanda et Crăcea E. — Comm. Soc. Sc. Méd.; Microbiologie, Parazitologie şi Epidemiologie, 1958.
9. Combiesco Cornelia et coll. — Microbiol. Parazitol. şi Epidemiol., 1956, **2**, 40.
10. Cornelson D., Sechter I., Bercovici C., Kahane D., Tudoran H. et Iosub C. — Studii şi Cercet. Acad. RPR, filiala Iaşi, seria I, 1955, anul VI, 1—2, 99.
11. Dryl L. et Marcinowska L. — Med. Dosw. Microbiol., 1952, **4**, 277.
12. Ferguson W., Juenker A et Ferguson R. — Am. J. Hyg., 1955, **62**, 306.
13. Henderson N. D. et Ferguson W. — Am. J. Hyg., 1949, **50**, 349.
14. Jude A., Nicolle P. et Ducrist P. — Ann. Inst. Pasteur, 1951, **81**, 245.
15. Nestoresco N., Popovici M. et Zilişteanu E. — Rev. Igienă, Microbiol. şi Epidemiol., 1953, **2**, 24.
16. Nicolle P. — Comm. au Congrès de Microbiologie, 1958, Stockholm.
17. Rusu V. — Rîşnov. Rapp. Ministère de la Santé et Prév. Soc., 1959.
18. Rusu V. — Rapp. Ministère de la Santé et Prév. Soc., 1957.
19. Scholtens R. Th. — Antonie van Leuwenhoek, 1956, **22**,
20. Sechter I., Bercovici C., Iosub C., Smilovici M. et Korber R. — Studii şi Cercet. St. Acad. RPR, filiala Iaşi, 1956, anul VII, 221.
21. Wiza I. — Med. Dosw. i. Microbiol., 1952, **4**. 115.

О ЗНАЧЕНИИ АССОЦИИРОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИЗОГЕННОСТИ *SALMONELLA TYPHI* С ПРЯМОЙ ЛИЗОТИПИЕЙ ДЛЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Путем совместного определения лизогенности и прямой лизотипии изучены 162 штамма, выделенные у носителей диагносцированных в местности, наиболее неблагополучной по сыпному тифу. Данные штаммы оказались нетипируемыми в 98,8% случаев, при применении серии, состоящей из 45 типовых фагов.

2. При применении дополнительных фагов, введенных в схему лизотипажа в 1958-ом году, 38-ой тип был найден в 51,9% случаев, оказываясь преобладающим типом в изучаемой зоне. Штаммы, принадлежащие к группе D, хотя не могли быть отнесены к определенному типу, проявили выраженную чувствительность к фагам D_7 и D_8.

3. Из общего числа штаммов, 42,5% проявили варианты «*in vitro*» и «*in vitro*» как в направлении атипичности, так и в направлении неопределяемых и W-форм. Такая выраженная степень изменчивости повидимому свойствена ттаммам, выделяемым у носителей и, вероятно, связана с эпидемиологической спецификой данной области.

4. Исследование лизогенности и чувствительности или только чувствительности выделенных в очаге штаммов по отношению к лизогенным фагам, дало возможность установить предшествующий лизотип 52 штаммов ((32,1%), среди которых: 33 давали атипичные реакции с фагами D-группы, 15 штаммов W-формы, 3 неопределяемых штамма и 1 деградированный штамм A.

Следовательно, ассоциация лизогенности с развернутой лизотипией дала указания эпидемиологического порядка, увеличивая количество штаммов с определяемым лизотипом от 1,2% — цифра полученная при применении одной лизотипии с 45 фагами — до 84,2%.

5. Неадаптированные фаги и определение биохимического типа не принесли в данном случае дополнительных указаний.

6. Фаги, происходящие от лизогенных штаммов, оказались индиферентными по отношению к типу 38 или трансформировали данный тип в неопределляемую форму; зато деградированный вариант A данного типа оказался способным к лизогенизации и перешел в штамм D-группы.

7. Полученные в работе данные показывают — в первую очередь — целесообразность ассоциирования определения лизогенности в качестве вспомогательного способа при лизотипии *S. typhi* с деградированными штаммами, и во вторую очередь — демонстрирует возможность совместного наличия факторов, способных обусловить переход одного лизотипа в другой, в естественных условиях.

BETRACHTUNGEN ÜBER DEN WERT DER ASSOZIIERUNG DER LYSOGENITÄT VON S. *TYPHI* MIT DER DIREKTEN LYSOTYPIE IN EPIDEMIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Hundertzweiundsechzig von Keimträgern aus der am stärksten typhogenen Ortschaft des Landes isolierte Stämme wurden durch Assoziierung der Lysogenität mit der direkten Lysotypie untersucht. Es ergab sich, dass bei 98,8% dieser Stämme die Typenbestimmung mit Hilfe eines Satzes von 45 Vi-Typenphagen nicht durchführbar war.

2. Durch Heranziehung von zusätzlichen Phagen, die 1958 in das Schema eingeführt wurden waren, konnte Typus 38 in 51,9% der Fälle identifiziert werden und erwies sich somit als der in der betreffenden Gegend vorherrschende Typus. Die Stämme der Gruppe D konnten zwar nicht in einen bestimmten Typus eingereiht werden, wiesen aber eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegenüber D_7 — und D_8-Phagen auf.

3. Von der Gesamtheit der Stämme, wiesen 42,5% *in vivo* und *in vitro*, atypische, unbestimmbare und W-Varianten auf. Dieses bemerkenswerte Ausmass von Variabilität scheint den von Trägern isolierten Stämmen eigen zu sein und steht höchst wahrscheinlich mit dem epidemiologischen Spezifikum des betreffenden Areals im Zusammenhang.

4. Durch Untersuchung der Lysogenität und der Empfindlichkeit, oder der Empfindlichkeit der Stämme aus dem Herd, gegenüber lysogenen Phagen, war es möglich den vorausgehenden Lysotypus von 52 Stämmen (32,1%) festzustellen. Davon wiesen 33 atypische Diaktionen mit Phagen der Gruppe D auf, 15 Stämme waren W-Formen, bei 3 Stämmen konnte der Typus nicht bestimmt werden, und einer war ein degradierter A-Stamm.

Die Assoziierung der Lysogenität mit der ausgedehnten Lysotypie lieferte somit wertvolle epidemiologische Hinweise, indem sie den Prozentsatz der Stämme mit bestimmbarem Lysotypus von 1,2% — wie durch ausschliessliche Verwendung der Lysotypie mit 45 Phagen erhalten — auf 82,4% erhöhte.

5. Nicht angepasste Phagen und die Bestimmung des biochemischen Typus ergaben, in diesem Falle, keine zusätzlichen Hinweise.

6. Lysogenitätsphagen zeigten sich dem Typus 38 gegenüber indifferent, oder verwandelten ihn in eine unbestimmbare Form. Dagegen erwies sich eine degradierte A-Variante dieses Typus als der Lysogenisierung fähig und wurde in einen Stamm der D-Gruppe umgewandelt.

7. Aus den Daten dieser Arbeit ergibt sich, vor allem, die Opportunität der Assoziierung der Lysogenität als Hilfsmittel bei der Lysotypie degradierter Stämme von *S. typhi*, sowie, in zweiter Linie, die Möglichkeit der Koexistenz gewisser Faktoren, welche die Umwandlung eines Lysotypus in einen anderen, unter natürlichen Bedingungen gestatten könnten.

CONSIDERATIONS CONCERNING THE VALUE OF ASSOCIATING THE LYSOGENICITY OF *S. TYPHI* WITH DIRECT LYSOTYPING IN EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION.

SUMMARY

1. One-hundred-and-sixty-two strains isolated from carriers detected in the most typhogenous locality of the country were studied by associating lysogenicity with direct lysotyping. In 98,8% of the cases these strains were found to be untypable with a set of 45 Vi typing phages.

2. By using additional phages introduced in 1958, type 38 was identified in 51.9% of the cases, i. e. it proved to be the prevailing type in the investigated area. Strains of the D group, although they could not be included in a definite type, displayed, however, a marked susceptibility to phages D_7 and D_8.

3. Of the total number of strains, 42.5% displayed atypical, untypable, or W variants "*in vivo*,, and "*in vitro*". The high degree of variability appears to be a peculiar property of strains isolated from carriers and is very probably connected with the specific epidemiological features of this area.

4. By investigating the lysogenicity and the sensitivity or the susceptibility of the strains from the hearth to lysogenic phages, it was possible to detect the precursor lysotype of 52 strains (32.1%), of which 33 displayed atypical reactions to phages of the D group, 15 were W strains, 3 strains were undeterminable, and 1 a degraded A strain.

It follows that the association of lysogenicity with extensive lysotyping afforded valuable epidemiological information, the rate of strains with a determined lysotype increasing from 1.2% — as obtained by using lysotyping with 45 phages as sole means of investigation — to 84,2%.

5. Unadapted phages and determinations of biochemical types did not furnish any additional information in the present case.

6. Lysogenicity phages were indifferent versus type 38, or transformed it into an untypable form. On the other hand, a degraded A variant of this type proved susceptible to lysogenization. and was transformed in a D group strain.

7. The above data suggest, in the first place, the opportuneness of associating lysogenicity as an auxiliary means in the lysotyping of degraded strains of *S. typhi*, and in the second place, they demonstrate the possibility of the coexistence of certain factors which might account for the transformation of one lysotype into another under natural conditions.

ECHERCHES SUR L'ANTIGÈNE Vi D'ORIGINE COLIBACILLAIRE

par

ECATERINA PAPAZIAN et LYDIA MESROBEANU

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Physiologie Microbienne)

— Manuscrit reçu le 4 juillet 1959 —

Les recherches entreprises ont eu pour but la préparation d'un antigène
-coli purifié, afin d'être incorporé à la place de l'antigène Vi-typhique dans
vaccin constitué par des endotoxines T.A.B., adsorbées sur des supports
néraux. Dans ce travail, nous rapportons nos résultats concernant l'extraction
les essais de purification de l'antigène Vi-colibacillaire.

Récemment, GORÎŞINA (2) a constaté qu'une souche de Coli (5396/38),
ssédant l'antigène Vi est 2 à 3 fois plus immunogène que la souche Ty_2.
mmunogénéité a été déterminée, soit par l'effet protecteur du sérum, soit
r la résistance des animaux à l'infection. ZAMUHOVSKAIA (7) propose même
troduction dans les vaccins typhiques de l'endotoxine Vi, extraite à partir
la souche Coli, mentionnée plus haut.

Dans une publication antérieure (3) nous avons montré qu'on pouvait
éparer un vaccin anti-typhique avec les endotoxines 0 (T.A.B.) et l'endotoxine
— adsorbées sur PO_4 Al. Ce vaccin, administré à la souris, lui confère une protec-
n évidente contre l'inoculation d'une dose mortelle de ces germes. Le même vaccin
voque chez l'homme l'apparition d'anticorps spécifiques à des titres élevés.

Une méthode similaire préconisée par RAUSS, JÓO et RETHY (5) a été appliquée
masse — en Hongrie — dans la période de 1940—1942. La vaccination de
0.000 personnes avec des endotoxines adsorbées sur $A1(OH)_3$ a donné des
ultats satisfaisants.

D'autre part, WEBSTER, LANDY et FREEMAN (6), LANDY et WEBSTER (4)
préparé un lipo-polysaccharide Vi purifié à partir de la même souche
colibacille que celle utilisée par les expérimentateurs soviétiques. Ce produit,
culé aux animaux et aux hommes, a montré qu'il possédait des qualités anti-
hiques remarquables.

Ces considérations nous ont incité à entreprendre l'étude de l'antigène
-colibacillaire. Nous nous sommes proposés de fixer en premier lieu la méthode
extraction de l'endotoxine Vi. Dans la littérature on trouve actuellement de
mbreuses méthodes pour l'extraction des endotoxines microbiennes, qui
rmettent d'obtenir des produits plus ou moins identiques du point de vue
ivité biologique, mais très différents par leur contenu en azote, substances
ductrices et acides gras. D'autre part, de nombreux expérimentateurs préfèrent
ployer pour l'extraction des substances antigéniques les germes deshydratés
r l'acétone à la place des germes frais, mais nous n'avons pas trouvé une
de systématique concernant les propriétés chimiques et biologiques des endo-
ines obtenues dans ces deux conditions de travail.

Dans le cadre de ces recherches, nous avons entrepris, en premier lieu, une étude comparative des propriétés chimiques et biologiques de l'antigène Vi, extrait par l'acide trichloracétique (1) des corps bacillaires frais et des corps acétonés. Nous avons essayé, par la suite, une méthode de purification de l'endotoxine Vi, obtenue à partir de germes frais.

★

Nos premières recherches ont été effectuées avec la souche coli « PISTA », (isolée d'une gastro-entérite) agglutinable par le sérum Bhatnagar, au titre de 1: 3200. L'endotoxine Vi extraite par l'acide trichloracétique, soumise à la dialyse, précipitait aisément par l'acétate d'uranyl, l'alun de K, les sels de lanthane, de cadmium, etc., permettant ainsi son isolement et purification ultérieure.

Nous avons constaté, après quelques mois, que la souche « PISTA » n'était plus agglutinée par le sérum anti qu'à un titre de 1: 320 et qu'elle donnait un extrait trichloracétique qui ne précipitait plus avec l'acétate d'uranyl, l'alun de K ou les sels de lanthane, etc. L'extrait contenait pourtant une quantité réduite d'antigène Vi, car le titre précipitant avec un sérum Bhatnagar (1/3200) variait selon les récoltes, entre 1/16—1/32.

Considérant que cette souche s'était dégradée, nous l'avons abandonnée. Après de nombreux essais effectués sur des souches coli agglutinables par le sérum Bhatnagar, nous nous sommes fixés à la souche coli 6203, conservée actuellement dans la collection de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino», à l'état lyophilisé.

Dans le dépistage des souches, riches en antigène Vi, nous avons tenu compte en premier lieu de leur titre agglutinant Vi et ensuite de l'abondance du précipité obtenu par l'addition de l'alun de K, du chlorure de lanthane ou de l'acétate d'uranyl à des solutions dont la concentration en antigène était identique et qui provenaient des souches à haut titre agglutinant. L'abondance du précipité obtenu, indique non seulement la richesse en endotoxine Vi de l'extrait trichloracétique dialysé, mais aussi le degré de polymérisation de l'endotoxine.

Les extraits préparés à partir de la souche 6203, en concentration de 100 mg% donnaient instantanément un précipité gélatineux, si l'on ajoutait 0,25 à 0,35 ml d'une solution saturée d'alun de K. Ce précipité, séparé par centrifugation, dissout dans de l'eau additionnée d'acide citrique est soumis à la dialyse et finalement précipité par l'addition de 4 volumes d'acétone.

Sur une solution contenant 1,5 mg par ml endotoxine Vi (coli 6203) nous avons contrôlé l'efficacité de la précipitation par les sels d'uranyl, de lanthane ou par l'alun de K. Les précipités gélatineux obtenus sont redissouts, dialysés et ramenés aux mêmes volumes; finalement, on pratique des réactions de précipitation avec le sérum Bhatnagar.

Les résultats de ces recherches sont exposés dans le tableau I.

Tableau I

Endotoxine Vi sol. 1,5 mg/ml.	Titre précipitant avec sérum Bhatnagar (1 : 1200)
Extrait trichloracétique dialysé	+1: 1024
Précipitation avec acétate d'uranyl	+1: 256
Précipitation avec alun de K	+1: 1024
Précipitation avec chlorure de lanthane	+1: 1024

A la suite de ces expériences, nous avons adopté pour la séparation de l'endotoxine Vi l'alun de K en solution saturée.

Extraction de l'antigène Vi à partir des corps microbiens frais ou des corps microbiens préalablement deshydratés par l'acétone.

Les cultures de 18 heures sur gélose sont lavées rapidement avec de l'eau distillée (refroidie à 4° C). La moitié du culot microbien est deshydratée par l'acétone pendant quelques jours. L'autre moitié est divisée en 2 parties égales, dont une est suspendue dans l'acide trichloracétique n/2 à raison de 3 gr germes poids sec pour 100 ml et l'autre à raison de 5 gr pour 100. Les germes deshydratés par l'acétone sont traités de la même manière que les germes frais. Après 24 heures de contact avec l'acide à la glacière, les suspensions microbiennes sont centrifugées à basse température et le liquide surnageant opalescent est soumis à une dialyse de 2 jours à l'eau courante et de 1 jour à l'eau distillée (+ 4° C). Après dialyse, la solution est traitée par 4 volumes acétone et le précipité formé, deshydraté avec de l'alcool, de l'éther et desséché sous vide. Toutes ces opérations sont poursuivies quantitativement.

Les quantités d'endotoxine Vi obtenues à partir des 8 suspensions microbiennes expérimentées sont exposées dans le tableau II.

Tableau II

Extrait trichloracétique pratiqué à partir des germes:		gr endotoxine Vi-coli pour 100 gr microbes secs — Extraction à partir de suspensions correspondant à une concentration de:	
		3%	5%
Vi « PISTA »	frais	10,9	6,5
	deshydratés par acétone	8,16	3,85
Vi 6203	frais	5	3,2
	deshydratés par acétone	4,5	2,5

Il ressort de ces expériences que si l'extrait trichloracétique se fait à partir d'une suspension trop riche en germes (5%) le rendement en endotoxine diminue considérablement. En effet, en réduisant pour la souche 6203, le taux des germes poids sec à 0,84 gr pour 100 ml, nous avons obtenu un extrait trichloracétique qui contenait 7% d'endotoxine Vi, alors que pour les concentrations de 3% et 5% on n'obtenait respectivement que 5 et 3,2%.

Il ressort, en plus, que le rendement en endotoxine est nettement inférieur lorsque les suspensions microbiennes se font à partir de germes deshydratés par l'acétone, la diminution étant plus accentuée pour la concentration de 5% que pour celle à 3%.

Les rendements en endotoxine Vi varient également avec la souche colibacillaire utilisée.

En ce qui concerne la composition chimique de ces endotoxines — celles obtenues à partir des germes deshydratés par l'acétone se caractérisent par un contenu en acides gras, réduit de 50% comparativement à celles obtenues à

partir des germes frais. Dans le tableau III sont exposées les différentes valeurs de l'N total, des acides gras et des substances réductrices trouvées à l'analyse des endotoxines Vi extraites à partir des suspensions microbiennes en concentration de 3% (poids sec). Les valeurs de l'N total et des substances réductrices totales sont presque similaires.

Tableau III

	Antigènes Vi provenant de la souche		en % endotoxine Vi		
			N. total	Acides gras	Substances réductrices
suspension 3%	Coli Pista	microbes frais	4,5	22,3	41,7
		microbes deshydratés	4,83	11,8	43,7
	Coli 6203	microbes frais	4,52	20,8	34,05
		microbes deshydratés	4,75	11,4	35,09

Boivin et Mesrobeanu avaient constaté que l'endotoxine typhique Vi se différencie des endotoxines 0 des germes Gram négatifs, par le fait qu'elle est très résistante à l'hydrolyse acide. Il faut recourir à l'autoclavage pour obtenir la séparation de ces componentes. Nous avons constaté que l'endotoxine Vi Coli se comporte pareillement. Pour la séparation de l'haptène polysaccharidique, l'endotoxine doit être chauffée en solution 2% d'acide acétique pendant une heure à 120°. Pour la libération complète des substances réductrices et des acides gras, le produit doit être chauffé en solution normale d'HCl toujours pendant 1 heure à 120°.

Nous avons aussi analysé une endotoxine Vi extraite de la souche Coli Pista en concentration de 5% (poids sec). Les résultats figurent dans le tableau IV d'où on peut déduire que la composition des endotoxines Vi coli extraites à partir des suspensions microbiennes 3% et 5% est pratiquement similaire quant à leur taux d'acides gras et sucres réducteurs.

Tableau IV

Antigène Coli Vi		En % d'endotoxine Vi		
		N total	Acides gras	Subst. réd.
Coli Pista suspension à 5%	microbes frais	3,7	21	40
	micr. deshydr. par acétone	6,2	10,1	38

On constate du tableau IV que la quantité de l'N total est augmentée ettement pour l'endotoxine provenant des microbes préalablement desséchés ar l'acétone et que les acides gras sont diminués de 50%.

Dans une autre série d'expériences, nous avons soumis la souche coli 6203 une digestion tryptique, préalablement à l'extraction trichloracétique.

La digestion a été effectuée en présence de chloroforme à pH 8, pendant heures à 37°. On additionne à 500 ml suspension microbienne fraîche ou étonée, de 3 et 5% conc., 1 gr de trypsine Difco (1: 250) en deux fractions 12 heures d'intervalle. Finalement, on introduit de l'acide trichloracétique ncentré pour obtenir n/2; après 24 heures de contact à la glacière et centri- gation, le surnageant est dialysé, précipité par 4 volumes acétone et deshydraté.

Nous avons constaté qu'à la suite de la digestion tryptique, le taux des bstances extractibles par l'acide trichloracétique et précipitables par l'acétone gmente de 15 à 20%, par rapport aux taux obtenus par extraction directe, ns digestion.

Le contenu en N total, acides gras et substances réductrices des endo- xines obtenus après digestion tryptique des germes, sont exposés dans le bleau V.

Tableau V

Digestion tryptique préalable à l'extraction trichloracétique		Résultats exprimés en % des substances précipitables par 4 volumes acétone		
		N. total	Ac. gras	Subst. réductrices
li Pista spension tiale 3%	microbes frais	6,92	22,3	39,0
	microbes deshydratés	9,66	7,7	35,0
li Pista spension tiale 5%	microbes frais	6,29	22,5	38,0
	microbes deshydratés	8,1	9	34,7

Il ressort de ce tableau que les valeurs de l'N total sont augmentées dans s endotoxines provenant des germes digérés par la trypsine préalablement l'extraction trichloracétique et cette augmentation est plus accentuée chez oir tab. III) les endotoxines provenant des germes deshydratés.

On remarque également une diminution nette des substances réductrices ns les endotoxines extraites des germes deshydratés. Chez ces mêmes pré- rations la diminution des acides gras est plus grande — environ 65% par mparaison aux endotoxines extraites des germes qui n'ont pas subi de digestion où elle représente environ 50%.

De l'ensemble de ces résultats ressortent les conclusions suivantes: utilisant ux souches de colibacille, riches en antigène Vi, pratiquement dépourvues antigène O, comparativement soumises à l'extraction trichloracetique sur les

germes frais et germes deshydratés par l'acétone on constate que le rendement en endotoxine est nettement supérieur quand on utilise les germes frais, que ce rendement est en fonction de la concentration initiale de l'extrait trichloracétique en germe frais ou deshydratés et qu'il diminue pour les suspensions concentrées. Cette diminution est encore plus accentuée pour les germes traités par l'acétone. Pour mieux mettre en évidence ces différences, nous avons rapporté dans le tableau VI les valeurs procentuelles de ces rendements, en considérant égal à 100 le rendement de l'extrait trichloracétique 3% des germes frais de la souche « PISTA », qui a donné la plus grande quantité d'antigène Vi.

Tableau VI

Extraction de l'endotoxine Vi		Rendements en endotoxine Vi pour une concentration initiale de la suspesion de	
		3%	et 5%
Souche Pista	microbes frais	100	59,5
	microbes deshydratés par l'acétone	75	28,4

Des différences nettes apparaissent également en ce qui concerne la constitution chimique des antigènes Vi obtenus des germes frais, par rapport à ceux obtenus des germes acétonés. Ces différences portent surtout sur la quantité des acides gras diminués d'environ 50% chez les endotoxines provenant des germes acétonés. Les substances réductrices et la quantité de N total sont presque similaires chez les endotoxines extraites des suspensions à 3%, mais pour celles provenant des suspensions microbiennes à 5%, la quantité de N est augmentée (tableau IV). L'extraction des germes, préalablement soumis à une digestion tryptique fournit des endotoxines Vi plus riches en N et dans le cas des germes acétonés avec un contenu diminué en acides gras (Tableau V).

Purification de l'antigène Vi obtenu à partir des germes frais.

1. Pour purifier l'endotoxine Vi obtenue à partir des germes frais de la souche Coli 6203 — suivant la technique précédemment décrite, on la dissout à raison de 2 mg/ml dans de l'eau distillée. Cette solution représente la préparation « Vi trichloracétique ».

2. Deux litres de cette solution sont traités par 15 ml de solution saturée d'alun de K — le précipité gélatineux formé, séparé par centrifugation, est repris dans l'eau distillée, en ajoutant une solution saturée d'acide citrique jusqu'à sa complète dissolution. Après une dialyse de 2 jours à l'eau courante et 1 jour à l'eau distillée, la solution est traitée par 4 fois son volume d'acétone. Le précipité formé, isolé par centrifugation, deshydraté par l'alcool et l'éther, est recueilli quantitativement. Rendement: 2.59 gr (64.6%) d'un produit qui est désigné par « Vi alun».

3. On dissout 1.5 gr du produit « Vi alun » dans du tampon phosphate, pH 8, à raison de 2 mg/ml. La solution est additionnée, à 2 reprises (à 12 heures d'intervalle) de 0,5 gr trypsine Difco (1: 250) pour 100 ml et de chloroforme. Le mélange est incubé pendant 24 heures à 37°, en corrigeant le

H, si nécessaire. Après centrifugation, le liquide surnageant ne donne pas de récipité par addition d'acide trichloracétique. On dialyse à l'eau courante et l'eau distillée et la solution est traitée par l'alun de K. Le précipité gélaneux formé, repris dans de l'eau distillée, acidifié par l'acide citrique jusqu'à issolution complète, est soumis à une nouvelle dialyse.

La solution dialysée est traitée ensuite avec une quantité d'alcool de 96°, écessaire pour réaliser une concentration de 30°. Le précipité formé est redissout ans de l'eau distillée et reprécipité par alcool, éther et désséché dans le vide. n obtient 0,65 gr d'une poudre blanche qui représente un rendement de 43.3% ar rapport au « Vi alun » et de 16.25% par rapport au Vi trichloracétique. e produit est désigné par « Vi trypsine ».

Dans le tableau VII sont exposées les valeurs obtenues pour les endotoxines Vi trichlor. », « Vi alun », « Vi trypsine » et « Vi germes deshydratés ». Cette ernière préparation correspond à la préparation « Vi trichloracétique » (non urifiée).

Tableau VII

	Pour % gr d'endotoxine				Titre précipitant d'une sol. antig. Vi = 2 mg/cc.		Titre agglutinant avec la souche 6203
ndotoxines	Subst. minérales	N total	Lipides	Subst. réductrices	Sérum antimicrobien 6203	Sérum antimicrobien Bhatnagar	Sérum antiendotoxine homologue
germes shydratés	11,45	4.75	11,40	35,09	± 1/4096	± 1/4096	0—40
'i trichlorétique »	8,24	4,52	19,82	34,05	± 1/4096	± 1/4096	0—40
'i alun »	11,14	3,25	23,13	25,16	+ 1/1024	+ 1/1024	0—1: 80
i trypsine »	6,02	2,25	23,10	22,58	+ 1/4096	+ 1/1024	1: 160— 1: 320

Il résulte de ces recherches qu'à la suite des différentes purifications, l'anène Vi colibacillaire perd environ 50% de l'N initial et 30% de substances ductrices. Son contenu en substances lipidiques est par contre légèrement gmenté (10%).

Le taux des substances minérales, plus élevé dans la préparation « Vi alun », minue par les purifications ultérieures. L'endotoxine Vi préparée à partir s germes deshydratés est plus riche en substances minérales et plus pauvre substances lipidiques.

L'examen de l'homogénéité électrophorétique, des trois préparations: « Vi chloracétique », « Vi alun » et « Vi trypsine » a été fait avec l'appareil de microctrophorèse libre de Kern LK 30. Ces essais nous ont permis de mettre évidence, dans l'endotoxine « Vi trichloracétique », 3 fractions: une première mobilité réduite *(a)* représentant 50.5%, une deuxième à mobilité interdiaire *(b)* représentant 19,25% et une dernière *(c)* à plus grande mobilité présentant 30,25% de la totalité de l'endotoxine « Vi trichloracétique ».

A la suite de la purification par l'alun de K, la fraction à mobilité intermédiaire (b) n'est plus décelable dans les graphiques, la fraction « a » représentant 89.5% et la fraction « c » 10,5% de la totalité de l'endotoxine « Vi alun ». La digestion trypsique et les précipitations par l'alcool 30% ne modifient plus l'aspect des courbes électrophorétiques, la fraction « a » représentant 89% et la fraction « c » 11% du produit purifié, malgré une diminution très nette de l'N total (de 3,25% à 2.25% Tableau VII).

Par chromatographie sur papier, nous avons identifié, dans toutes nos préparations, les sucres suivants: glucose, galactose et xylose. Une tache très discrète correspondant au Rf du ribose est décelable dans tous les produits analysés, étant plus intense dans l'endotoxine « Vi trypsine ».

L'étude des propriétés immunologiques de l'endotoxine Vi colibacillaire.

Ces recherches ne comprennent dans ce mémoire que quelques données à caractère d'orientation:

Pour déterminer la DLM/100 de la souche Coli 6203, ayant servi à la purification de l'antigène Vi, nous l'avons inoculée à des souris blanches de 18 gr par voie intrapéritonéale. Les différentes dilutions des cultures de 20 heures, étaient étalonnées avec du SO_4Ba, selon Brown. Chaque dilution était inoculée à un lot de 10 souris maintenues en observation pendant 7 jours. La DLM/100 de cette souche a été de 2×10^8 germes.

Pour déterminer la toxicité des différentes préparations Vi, nous avons inoculé dans le péritoine des souris blanches de 18 gr, 0,5 ml des solutions à concentrations différentes. L'endotoxine Vi provenant des germes deshydratés, de même que l'endotoxine provenant des germes frais, tuent à raison de 0,3 mg 60% des animaux inoculés, en maximum trois jours. Il en est de même des endotoxines purifiées par l'alun et par la digestion trypsique.

Le pouvoir immunogène des préparations « Vi trichloracétique », « Vi alun » et « Vi trypsine » a été contrôlé par leur inoculation à des lapins de 2500 gr. Des essais sur des lots de 10 lapins ont montré que les endotoxines « Vi trichloracétiques » préparées à partir des germes frais ou de germes deshydratés, ne déterminent qu'irrégulièrement l'apparition des agglutinines dans le sérum sanguin des animaux inoculés. Les résultats ne sont pas meilleurs après hyperimmunisation ou administration des endotoxines respectives adsorbées sur phosphate d'aluminium. Les titres agglutinants des sérums varient entre 0—1/40.

Le sérum de quelques lapins inoculés avec l'endotoxine «Vi alun» agglutinait la souche d'origine dans une dilution de 1/80, tandis que les sérums des 10 lapins inoculés avec l'endotoxine «Vi trypsine» avaient un titre agglutinant compris entre 1:160—1:320.

Le contrôle du pouvoir protecteur du sérum anti «Vi-trypsine» a montré que 0,5 ml étaient capables de protéger 100% des souris inoculées contre une DLM/100 et 90% contre deux DLM/100 germes vivants.

Des essais d'immunisation active des souris n'ont été faits qu'avec les endotoxines «Vi-alun» et «Vi-trypsine». Des lots de 10 souris ont reçu, par voie intrapéritonéale, 0,1 mg de l'endotoxine à essayer et 15 jours après, des quantités variables de germes vivants (1,2,3 et 4 DLM/100). Les souris du lot immunisé avec l'endotoxine « Vi alun» survivaient 100% à l'injection de 1 DLM/100, 90% à l'infection de 2 et 3 DLM/100 et 50% à l'injection de 4 DLM/100.

Pour les lots des souris immunisées avec 0.1 mg endotoxine « Vi trypsine » s pourcentages des souris ayant survécu a été de 100% pour 1 et 2 DLM/100,)% pour 3 DLM/100 et 70% pour 4 DLM/100.

Des recherches, qui feront l'objet d'un autre mémoire, sont poursuivies ctuellement dans le but de préparer un lot expérimental de vaccin, dans la com-)sition duquel entrerait à part les endotoxines O typhiques (T.A.B.) l'endotoxine Vi trypsine» coli 6203; chacune des endotoxines étant adsorbées sur phosphate d'aluminium.

RÉSUMÉ

De l'ensemble de ces recherches résultent les faits suivants:

Le rendement en endotoxine Vi-colibacillaire par extraction à l'acide tri- hloracétique des germes frais est supérieur à celui des germes préalablement raités par l'acétone.

Les rendements dépendent de la souche utilisée et, pour la même souche, u poids sec des germes soumis à l'extraction, dans le sens que la quantité d'endo-)xine Vi obtenue est inversement proportionnelle à la concentration initiale des ermes.

La composition de l'endotoxine Vi est différente, selon qu'elle provient de ermes frais ou de germes préalablement traités par l'acétone. Les différences)rtent surtout sur le contenu en acides gras, qui est de 50% inférieur dans les ndotoxines extraites des germes acétonés.

De même que l'endotoxine Vi typhique, l'endotoxine Vi colibacillaire est ès résistante à l'hydrolyse acide. La séparation de l'haptène polysaccharidique écessite un chauffage d'une heure à 120° dans une solution d'acide acétique iluée, tandis que la libération complète des substances réductrices nécessite un hauffage d'une heure à 120°, en solution normale d'HCl.

Pour la purification de l'endotoxine Vi colibacillaire, on pratique l'extrac- on trichloracétique à partir des germes frais et on précipite l'endotoxine par alun de K. Cette endotoxine est soumise à une digestion trypsique, de nouveau récipitée par l'alun de K et finalement par l'alcool à 30%. Le produit final urifié ne contient que 2,25% de N total, soit 50% moins que le produit brut xtrait trichloracétique dialysé).

L'analyse électrophorétique des produits, dans le cas de la purification montré que l'une des 3 componentes, présente dans le produit initial, n'est lus décelable dans les produits obtenus dans les autres stades de la purification, ien que la quantité de N total continue à diminuer.

L'étude de la valeur immunogène des endotoxines colibacillaires obtenues ommairement exposée dans ce mémoire) nous a montré que le produit initial Vi trichlorac.» tout aussi toxique que les produits purifiés, inoculés aux lapins, e stimule que faiblement et de manière inconstante, l'apparition des agglutinines. ar contre, le produit obtenu après la purification «Vi trypsine» est capable de timuler chez tous les 10 lapins inoculés l'apparition d'agglutinines, à un titre lus élevé (1:180 — 1:320).

Malgré les différences qui existent du point de vue contenu en acides gras, s propriétés toxiques et immunologiques des endotoxines Vi, extraites à partir es germes frais ou des germes préalablement traités par l'acétone, sont sensi- lement les mêmes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boivin A., Mesrobeanu I. et Mesrobeanu L. — C. R. Soc. Biol. 1933, **113**, 490.
2. Gorîşina L. V. — Nauk. osn. proizv. bakt. prep., Moskva, 1957, p. 45,
3. Iliesco M., Mitrică N. et Mesrobeanu L. — Stud. şi Cerc. de Infra. Microbiol. şi Parazitol. 1956, **7**, 159.
4. Landy M. et Webster M. E. — J. Immunol., 1952, **69**, 143.
5. Rauss K., Jóo I. et Rethy L. — Ann. Immunol. Hungaricae, 1958, **1**, 108
6. Webster M. E., Landy M. et Freeman M. — J. Immunol. 1952, **69**, 135.
7. Zamuhovskaia A. N. — Jurn. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol. 1958, no. 3, 88

ИЗУЧЕНИЕ Vi — АНТИГЕНА У КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В данном докладе изучалось приготовление Vi-антигена кишечной палочки в виду его включения в тифознопаратифоз ную вакцину, состоящую из углеводно-липоидных эндотоксинов О, адсорбированных на минеральной основе.

В работе применяли два штамма, причем в первую очередь старались установить методики экстрагирования, применяя трихлоруксусную кислоту.

Полученные результаты дали возможность придти к следующим выводам:

Выход эндотоксина Vi различен в связи с применяемым штаммом и для одного и того же штамма, смотря потому как экстракция проводится на влажных микробах или на обезвоженных; в последнем случае выход более низкий.

Что касается химического состава, отмечены различия между эндотоксинами Vi, происходящими из обезвоженных микробов и эндотоксинами, полученными из влажных микробов, а именно, количество жирных кислот снижается на 50%.

Vi-эндотксин кишечной палочки, также как и тифозные Vi-эндотоксины, очень устойчив к кислотному гидролизу.

Vi— эндотоксин кишечной палочки, вытянутый из влажных микробов, очищался путем преципитации квасцами, триптическим перевариванием и дробной преципитацией спиртом, причем достигнуто уменьшение на 50% количества азота.

Несмотря на относительно одинаковую токсичность для мышей, иммуногенность коли-Vi-эндотоксина оказалась увеличенной

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS Vi-ANTIGEN COLIBAZILLÄRER HERKUNFT

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Darstellung eines Coli-Vi-Antigens studiert, mit dem Zwecke es einem, aus glucidolipidischem, an einen Mineralträger adsorbierten Endotoxin bestehenden T.A.B. — Impfstoff einzuverleiben.

Die Untersuchung wurde an zwei Stämmen durchgeführt. Es wurde zunächst versucht die Extraktionsmethode mit Trichloressigsäure festzulegen. Es ergaben sich folgende Schlussfolgerungen.

Die Ausbeute an Vi-Endotoxin schwankt in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm. Beim gleichen Stamm treten Unterschiede auf, je nachdem zur Extraktion feuchte oder entwässerte Keime benutzt werden. In letzterem Falle ist die Ausbeute geringer.

Was die chemische Zusammensetzung anbetrifft, bestehen Unterschiede zwischen den Endotoxinen aus feuchten und aus entwässerten Keimen, insofern der Fettsäuregehalt bei letzteren um 50% niedriger ist.

Colibazilläre Vi-Endotoxine sind, ebenso wie Typhus-Vi-Endotoxine, gegen Säurehydrolyse sehr widerstandsfähig.

Das aus feuchten Keimen extrahierte Coli-Vi-Endotoxin wurde durch Fällung mit Alaun, Trypsinverdauung und fraktionierte Alkoholfällung gereinigt, wobei eine Herabsetzung des Stickstoffgehaltes um 50% erzielt wurde.

Obwohl die Mäusetoxizität bei beiden Präparaten von relativ gleicher Grössenordnung ist, scheint die Immunogenität des gereinigten Coli-Vi-Endotoxins erhöht zu sein.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE Vi ANTIGEN OF COLIBACILLARY ORIGIN

SUMMARY

The preparation of a coli Vi antigen was studied with a view to including it in a T.A.B. ccine consisting of glucidolipidic O endotoxins adsorbed on to a mineral support.

Two strains were used in the investigation, whose primary aim it was to establish te method of extraction by means of trichloroacetic acid. The following conclusions were ached:

The yield of Vi endotoxin differs according to the strain used. In the same strain diffe- nces are found to exist according as to whether the extraction is performed in moist dehydrated germs, lower yields being obtained in the latter case.

As regards chemical composition, differences are observed to exist between Vi endo- xins obtained from dehydrated and from moist germs, inasmuch as the amount of fatty ids is decreased by 50% in the former.

Colibacillary Vi endotoxins, like typhoid Vi endotoxins, are highly resistant to acid drolysis.

Coli Vi endotoxins extracted from moist germs were purified by means of alum preci- ation, tryptic digestion, and fractioned alcohol precipitation. A decrease of the N contents 50% was obtained.

Although the toxicities of the products in mice are relatively of the same order, the munizing potency of purified coli Vi endotoxin appears to be increased.

ÉTUDE DES CARACTÈRES BIOLOGIQUES DES *BACILLES TYPHIQUES* ISOLÉS DES MALADES DE FIÈVRE TYPHOÏDE VACCINÉS ET NON-VACCINÉS AU T.A.B.

par

CORNELIA COMBIESCO, E. CRĂCEA, EVA GORUN et INGE ELIAN

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 20 juin 1959 —

L'étude de l'infection typhoïdique a fait l'objet de nombreux travaux concernant soit l'agent pathogène, soit l'organisme-hôte.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature examinée une étude systématique comparative entre les souches des bacilles typhiques isolées des malades vaccinés au T.A.B. avant de contracter la maladie et celles provenant des non-vaccinés.

Une pareille étude serait justifiée par les considérations suivantes:

a) Le fait d'isoler des vaccinés des souches à pathogénité plus élevée que celle des non-vaccinés, prouverait que la vaccination rend l'organisme résistant à l'infection avec des souches à pathogénité moyenne ou faible.

b) L'isolement des vaccinés des souches présentant un caractère biologique déterminé plus prononcé, indiquerait peut-être, que ce caractère est celui qui a permis au germe de vaincre la résistance de l'organisme immunisé.

Le présent travail représente un essai dans le sens sus-indiqué.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les souches étudiées provenaient soit de malades non-vaccinés, soit de malades qui avaient reçu le vaccin T.A.B. antérieurement à la maladie. L'isolement des souches a été fait par hémoculture avant l'institution du traitement aux antibiotiques (chloromycétine) et seulement dans un cas par coproculture (chap. VI).

On a étudié les suivants caractères biologiques des souches, conservées à +4°C sur milieu avec oeuf Dorset, au cours des deux premiers mois de leur isolement: type bactériophagique, caractères sérologiques, virulence, toxicité, capacité agressive, immunogénéité, ainsi que la forme clinique du cas dont les souches respectives étaient isolées.

1. *Type bactériophagique.* Le type bactériophagique a été étudié selon la méthode de Craigie et Yen, adoptée par les laboratoires de routine pour typage bactériophagique.

2. *Caractères sérologiques.* (La présence des antigènes « O » et « Vi »). L'antigène « O » a été mis en évidence par agglutination, avec sérum anti « O » (titre 1/4800), préparé avec la souche O_{901} bouillie et l'antigène « Vi » avec sérum anti-Vi (titre 1/1000) préparé avec la souche « Vi » Ballerup.

3. *Virulence.* On a préparé à partir de cultures de 14—16 heures, sur gélose inclinée, des doses de 100, 200 et 400 millions germes comprises dans

0,5 ml, suspendues en solution Ringer. Ces doses étaient inoculées par voie intrapéritonéale à des souris mâles de 14—16 gr; on a utilisé pour les premières 2 doses—8 animaux pour chaque dose, et pour la dernière dose 3 souris (durée d'observation 72 heures).

4. *Toxicité.* On a utilisé des cultures de 18—20 heures sur agar, suspendues en solution physiologique, inactivées 1 heure à 58°C. Inoculation intrapéritonéale (500 millions et un milliard germes en volume de 0,5 ml) à des souris de 17 gr (4 pour chaque dose; observation 72 heures).

5. *Capacité agressive.* Pour la technique et l'interprétation des résultats nous nous sommes guidés par les travaux de BERMAN (6,7). La propriété agressive des germes a été testée par le titrage de la dose agressive minimum (D.A.M.), qui, inoculée par voie sous-cutanée dans la région inguinale, se disséminait dans le sang et les organes. Pour les premiers titrages d'orientation on a employé des doses de 50, 100, 200 et 400 millions germes vivants, contenues dans 0,25 ml, inoculées dans la région inguinale droite, à des groupes de 2 animaux. A intervalle de 30, 60 et 120 minutes, les animaux étaient sacrifiés à l'éther et autopsiés. On prélevait, de manière stérile, la rate entière et un fragment de foie de la même taille approximativement, qui étaient homogénéisés séparément dans un mortier en y ajoutant 5 gouttes de sérum physiologique, et ensemencés sur boîte avec agar à l'aide d'une anse en platine de 4 mm diamètre. Simultanément, on ensemençait le sang du cœur dans du bouillon et sur gélose inclinée. Incubation 24 heures à 37°. Le lendemain, on comptait les colonies de bacilles typhiques de chaque boîte en contrôlant par agglutination sur lame à l'aide des sérums « O » et « Vi ». De même la culture obtenue du sang du cœur était controlée par agglutination sur lame. Les ensemencements de la rate et du foie donnant des résultats similaires, nous nous sommes limités aux ensemencements de la rate. Après une série d'essais on s'est fixé à la dose de 100 millions germes, laquelle pour certaines souches, était suivie de la pénétration des germes dans la rate des souris testées, en proportion de 100%, après un intervalle de 30 minutes; l'intervalle de sacrifice a été établi à 30 et 60 minutes. Les suspensions microbiennes, effectuées des cultures de 12—14 heures, étaient inoculées immédiatement après leur préparation. Lorsque plusieurs souches étaient testées le même jour, elles étaient ensemencées la veille, à des intervalles différents, afin d'assurer une uniformité en ce qui concerne l'âge des cultures. Au début des expériences on a déterminé le nombre des microorganismes vivants des suspensions, mesurées par la méthode turbidimétrique, en comptant les colonies sur plaques avec agar. Le nombre des germes viables variait entre 65—102 millions pour la dose de 100 millions germes déterminée par néphélométrie. Les souris dont on a obtenu des cultures du cœur ou de la rate positives avec des bacilles typhiques, ont été considérées envahies.

6. *Immunogénéité.* L'immunogénéité a été déterminée par immunisation sous-cutanée des souris mâles (16—17 gr) avec suspensions préparées par la même méthode que celle pour la recherche de la toxicité, mais phénolées à $5^0/_{00}$. On a effectué deux séries d'immunisations:

a) Un groupe de souris inoculées 2 fois avec 100 millions germes à sept jours d'intervalle; dix jours après la dernière inoculation les souris étaient infectées par voie intrapéritonéale avec une dose test (1 DLM), préalablement établie et contrôlée au moment de l'infection par un lot témoin.

b) Un autre groupe de souris immunisées par trois inoculations de 100, 100 et 200 millions germes chacun à sept jours d'intervalle; 10 jours après la

Tableau Ia

A.— Propriétés biologiques des souches S. typhi isolées des malades non-vaccinés, sans traitement antibiothique, avant que le germe soit isolé.

No. souche	Forme de maladie	Provenance	Agglutination			Virulence						Toxicité		Invasion (100 mill.) germes			
			Type phagique	Sérum anti « O »	Sérum anti « Vi »	100 mill.	%	200 mill.	%	400 mill.	%	500 mill.	1000 mill.	30 minutes no. absolu	%	1 heure no. abs.	%
18180	évolution de longue durée	hémoculture	D_1	1/400	1/1000	2/3	66,6	3/3	100	3/3	100	3/4	4/4	3/3	100	3/3	100
18730	longue durée rechute	hémoculture	A	1/800	1/800	5/8	62,5	8/8	100	3/3	100	0/4	0/4	3/3	100	3/3	100
19608	moyenne	hémoculture	non-déterminé	1/800	1/1200	3/3	100	3/3	100	3/3	100	0/4	0/4	0/3	0	1/3	33,3
19205	légère.	hémoculture	A	1/400	1/1200	4/8	50	7/8	87,5	3/3	100	2/4	3/4	3/3	100	2/3	66,6
21019	moyenne	hémoculture	E_1	1/2000	1/1200	1/8	12,5	5/8	62,5	3/3	100	1/4	0/4	0/3	0	3/3	100
18071	légère	hémoculture	A	1/800	1/400	4/8	50	5/8	62,5	3/3	100	0/4	0/4	3/3	100	4/4	100
18086	?	hémoculture	D_1	1/800	1/800	3/8	37,5	5/8	62,5	3/3	100	0/4	2/4	1/3	33,3	0/3	0
20156	?	hémoculture	F_1	1/1600	1/800	1/8	12,5	2/8	25	3/3	100	1/4	2/4	1/4	25	2/4	50
20045	moyenne	hémoculture	A	1/800	1/800	2/8	25	6/8	75	2/3	66,6	0/4	1/4	2/4	50	2/3	66,6
19333	moyenne	hémoculture	E_1	1/800	1/800	3/8	37,5	3/8	37,5	2/3	66,6	0/4	1/4	2/4	50	4/4	100
20046	moyenne	hémoculture	F_1	1/800	1/800	1/8	12,5	2/8	25	3/3	100	0/4	1/4	4/4	100	3/4	75
20382	moyenne	hémoculture	A	1/1600	1/800	1/8	12,5	3/8	75	3/3	100	0/4	1/4	4/4	100	3/4	75
Frecăţeano	moyenne	hémoculture	A	1/1600	1/800	3/8	37,5	8/8	100	3/3	100	0/4	0/4	2/4	50	3/4	75
Pană	moyenne	hémoculture	Adegrad.	1/800	1/200	8/8	100	6/8	75	3/3	100	0/4	0/4	3/4	75	4/4	100

LÉGENDE: Sérum anti-typhique « O » — titre 1/4800
Sérum anti « Vi » — titre 1/1000
Virulence et toxicité = souris mortes souris testées
Invasion = souris envahies
souris testées

Tableau Ib

B.— Propriétés biologiques des souches de S. typhi isolées des malades vaccinés, sans traitement antibiothique avant que le germe soit isolé.

No. souche	Forme de maladie	Provenance	Agglutination			Virulence						Toxicité		Invasion (100 mill.) germes			
			Type phagique	Sérum anti « 0 »	Sérum anti « Vi »	100 mill.	%	200 mill.	%	400 mill.	%	500 mill.	1000 mill.	30 minutes no. absolu	%	1 heure no. absolu	%
16708	légère	hémoculture	C_1	1/2000	1/800	1/3	33,3	3/3	100	2/3	66,6	0/4	1/4	3/3	100	1/3	33,3
19706	à longue durée rechute	hémoculture	A	1/4000	1/1200	2 3	66,6	2 3	66,6	3 3	100	3 4	3 4	3 3	100	3 3	100
22157	à longue durée	hémoculture	F_1	1/2000	1/1200	0 6	0	3 6	50	4 6	66,6	0 4	2 4	0/3	0	1/3	33,3
19025	légère	hémoculture	D_1	1/3200	1/1000	2/8	25	2/8	25	3/3	100	0/4	0/4	3/3	100	2/4	50
20048	moyenne	hémoculture	A	1/100	1/400	5/8	62,5	7/8	87,5	3/3	100	0/4	0/4	4/4	100	3/4	75
Ursulesco	moyenne	hémoculture	F_1	1/3200	1/400	0/8	0	2/8	25	2/3	66,6	0/4	1/4	3/4	75	1/4	25
Roşca E.	moyenne	hémoculture	atypique	1/800	1/800	2/8	25	1/8	12,5	3/3	100	0/4	1/4	2/4	50	3/4	75
Berstein	à longue durée	hémoculture	D_1	1/200	1/200	5/8	62,5	5/8	62,5	3/3	100	2/4	0/4	2/4	50	3/4	75

LÉGENDE: Sérum anti-typhique « 0 » — titre 1/4800
Sérum anti « Vi » — titre 1/1000
Virulence et toxicité — souris mortes, souris testées
Invasion = souris envahies, souris testées

rnière inoculation, les souris étaient testées par le test d'invasion avec la se de 100 millions germes vivants, en volume de 0,25 ml en solution physiogique, inoculée par voie souscutanée, dans la région inguinale.

RÉSULTATS

On a étudié du point de vue des caractères mentionnés, 22 souches: 8 uches isolées des malades vaccinés et 14 des malades non-vaccinés au T.A.B. ant de contracter la maladie.

Le Tableau I, donne les résultats des tests.

L'étude comparative détaillée des divers caractères biologiques des souches isolées s non-vaccinés et vaccinés au T.A.B.

I. *Type bactériophagique.* On constate une grande diversité de types bactériophagiques, indifféremment de la provenance des souches (vaccinés, nonccinés). A l'exception d'une souche isolée des non-vaccinés (type A dégradé) tes les souches ont réagi avec la série de phages employés conformément a schéma standard de diagnostic, ce qui prouve que l'organisme vacciné n'inence pas la sensibilité phagique des souches de bacilles typhiques.

II. *Présence des antigènes « Vi » et « O » typhiques.*

Tableau II

Contenu en antigène		Souches isolées des	
Vi	0	non-vaccinés	vaccinés
+++.....	±	12	4
++, +++	++	1	3
±.....	±	1	1
Total souches		14	8

Légende: ++, +++ = contenu riche en antigène; agglutination de plus de la moitié du titre du sérum.
± = contenu faible en antigène; agglutination au dessous de la moitié du titre du sérum.

La grande majorité des souches (vaccinés ou non-vaccinés) étaient riches antigène « Vi »; aucune n'appartenait à la forme W; une seule de chaque égorie était faiblement agglutinée par le sérum « Vi » ainsi que par le sérum O ». Aussi ces deux dernières souches ont pu être typisées avec des phages Vi » monovalents antityphiques.

III. *Virulence.* Le tableau III contient les résultats ainsi que le critérium ppréciation des résultats.

Tableau III

Catégorie	Critériums d'appréciation des résultats	Souches isolées des	
		Non-vaccinés	vaccinés
virulentes	mortalité souris 100% (dose 100 millions)	2	—
ulentes	mortalité 100% (dose 200 millions) ou plus de 50% pour les 2 premières doses	6	4
blement ulentes	mortalité 100% (dose 400 millions) et au-dessous de 50% pour les 2 premières doses	6	4

Le tableau III indique qu'il n'y a aucune différence, en ce qui concerne la virulence, entre les souches isolées des non-vaccinés et celles des vaccinés; les souches virulentes des non-vaccinés représentent 57% et celles des vaccinés 50% par rapport au nombre des souches étudiées (vaccinés et non-vaccinés respectivement).

IV. *Toxicité.* Le tableau IV représente la toxicité pour les différentes souches.

Tableau IV

Catégorie	Critériums d'appréciation des résultats	Souches isolées des	
		non vaccinés	vaccinés
toxiques	mortalité dépassant 50% (pour 1 milliard germes)	4	2
toxicité faible	mortalité inférieure à 50% (pour 1 milliard germes)	4	3
non-toxiques	mortalité 0% (pour 1 milliard germes)	6	3

La toxicité a été réduite, tant chez les vaccinés que chez les non-vaccinés.

V. *Invasion.* Les résultats du test d'invasion sont exposés dans le tableau V.

Tableau V

Catégorie	Critériums d'appréciation des résultats	Souches isolées des	
		non-vaccinés	vaccinés
invasives	envahies: plus de 50% des souris	10	7
faiblement invasives	envahies: moins de 50% des souris	4	1

Les souches isolées des vaccinés, ainsi que celles des non-vaccinés, donnent un pourcentage très élevé de souches invasives. Le pourcentage des vaccinés est un peu plus élevé (87,5%) que celui des non-vaccinés (71,4%).

VI. *Pathogénité chez les souris vaccinées avec du vaccin* T.A.B. *standard*

1. *Test par infection intrapéritonéale.* Quatre lots de 30 souris chacun étaient immunisées avec du vaccin T.A.B. standard (voir « Matériel et Méthodes » Immunogénéité, par. a) Chaque lot a été infecté séparément par voie intrapéritonéale, avec l'une des souches: 18180, 19706, 19608, 15409, avec 1 et 2 D.L.M.

Caractères biologiques des souches infectantes:

18180: souche virulente, toxique, invasive, isolée de sujet non-vacciné.

19706: souche modérément virulente, toxique, invasive, isolée de vacciné.

19608: souche virulente, atoxique, faiblement invasive, isolée de non-vacciné.

15409: souche modérément virulente, atoxique, faiblement invasive, isolée de vacciné.

La souche 15409 isolée par coproculture, a été employée dans cette expérience, n'ayant à notre disposition — parmi les souches isolées par hémoculture des vaccinés — une autre souche possédant les caractères nécessaires.

Les résultats sont donnés dans le tableau VI.

Tableau VI

Souche infectante	Dose infectante	Mortes/ inoculées	Survivantes %	Témoins morts/inoculés	Pourcentage final de survie [1]) %
18180 (virulente non-vacciné) ..	1 DLM	3/11	72,7	10/13	49
	2 DLM	9/15	40	/	/
19706 (modérément virulente vacciné)	1 DLM	0/12	100	10/13	77
	2 DLM	8/15	46,6	/	/
19608 (virulente non-vacciné)	1 DLM	10/13	30	13/13	30
	2 DLM	14/15	6,6%	/	/
15409 (modérément virulente vacciné)	1 DLM	0/11	100	7/12	58,4
	2 DLM	6/14	57	/	/

[1]) représente la différence entre la survie % chez les souris immunisées et témoins.

Du tableau VI il ressort que le vaccin T.A.B. standard a mieux protégé contre les souches isolées des vaccinés que les souches des non-vaccinés. Cette différence pourrait s'expliquer, en partie, aussi par le fait que les deux souches des vaccinés (19706, 15409) sont un peu moins virulentes que celles des non-vaccinés.

2. *Test par invasion.* L'immunisation des animaux a été faite selon le schéma indiqué au chapitre « Matériel et Méthodes », Immunogénéité paragr. *b)*. Le test d'invasion a été effectué séparément, avec les souches 18180, 19706, 19608, 15409, utilisées en doses de 250 millions germes. On a testé séparément, le pouvoir invasif sur souris normales (témoins) avec la même dose de germes.

Tableau VII

Souche inoculée	Isolée de	Souris immunisées		Témoins		
		envahies/ inoculées	survivantes %	Envahies/ inoculées	Survivantes %	Pourcentage final de survie [2])
18180	non-vacc.-invasive	3/8	62,5	7/8	12,5	50
19706	vacc.-invasive	2/8	75	7/8	12,5	62,5
19608	non-vacc.-faibl. invasive..	4/8	50	6/8	25	25
15409	vacc.-faibl. invasive	3/8	62,5	5/8	37,5	25

[2]) représente la différence entre la survie % chez les souris immunisées et celle des témoins.

Le tableau VII montre que par le test de l'invasion, il semble qu'il n'y a pas de différence significative entre les diverses souches de vaccinés et non-vaccinés, en ce qui concerne leur capacité d'envahir les souris immunisées avec du vaccin T.A.B. standard.

VII. *Immunogénéité de diverses souches isolées des vaccinés et non-vaccinés.*

1. *Test par infection intrapéritonéale des souris immunisées.* L'immunisation des animaux a été effectuée selon le schéma décrit au chapitre « Matériel et Méthodes » — Immunogénéité, paragr. *a)*. L'infection intrapéritonéale a été faite avec la souche Ty_2 Vi, doses de 1 et 2 D.L.M. (Tableau VIII).

Tableau VIII

Souche vaccinante	Isolée de	Caractères biologiques	Dose Ty 2	Mortes/ inoculées	Pourcent % survie
18180	Non-vacc.	Virulente, toxique, invasive	1 DLM	2/15	86,6
			2 DLM	4/15	73,3
19706	Vacc.	Modérément virulente, toxique, invasive	1 DLM	5/15	66,6
			2 DLM	8/15	46,6
18071 Pana	Non-vacc.	Virulente, atoxique, invasive	1 DLM	6/15	60
			2 DLM	13/15	13,3
20048	Vacc.	Virulente, atoxique, invasive	1 DLM	9/15	40
			2 DLM	11/15	26,6
19608	Non-vacc.	Virulente, atoxique, faiblement invasive	1 DLM	4/15	73,3
			2 DLM	11/15	26,6
15409	Vacc.	Modérément virulente, atoxique, faiblement invasive	1 DLM	5/15	66,6
			2 DLM	9/15	40
20156	Non-vacc.	Faiblement virulente, faiblement toxique, faiblement invasive	1 DLM	8/15	46,6
			2 DLM	13/15	13,3
Ursulesco	Vacc.	Faiblement virulente, atoxique, faiblement invasive	1 DLM	9/15	40
			2 DLM	11/14	21,4
Témoins			1 DLM	15/15	—
			2 DLM	14/15	6,6

Nous rapportant aux résultats obtenus par l'infection avec 1 D.L.M. Ty il résulte du tableau VIII, que les souches isolées des non-vaccinés ont été plu

immunogènes que celles des vaccinés. Cette constatation est valable pour chacune des catégories établies, en vertu des caractères biologiques des souches vaccinantes.

2. *Test par invasion des souris immunisées.* L'immunisation des animaux et le test d'invasion des souches de bactéries typhiques a été faite selon le schéma décrit au chapitre « Matériel et Méthodes » — Immunogénéité — paragr. *b)*; divers mélanges de souches ont été utilisés, isolées des vaccinés et non-vaccinés, dont les caractères étaient:

18071, Pana, 20048 — souches invasives, virulentes, toxiques.

20156, Ursulesco — faiblement invasives, faiblement virulentes, atoxiques.

Le test d'invasion a été effectué avec les mêmes souches, chaque lot de souris vaccinées étant testé avec la totalité des souches (excepté la souche 18071, qui n'a plus été utilisée, ayant la même provenance — de non-vacciné — et les caractères biologiques de la souche Pana).

Les résultats figurent dans le tableau IX.

Tableau IX

Souches vaccinantes	Isolées de	Résultats invasion — (envahies/inoculées)						Total envahies/ inoculées	Pourcentage survivants % (no. 1)	Pourcentage survivants% (no. 2)	Pourcentage survivants % (no. 3)
		Souches invasives			Souches faiblement invasives						
		Pană	20048	Total	20156	Ursulesco	Total				
18071 + Pană	non-vacc.	2/6	4/6	6/12	3/6	4/5	7/11	13/23	50	36,3	43,4
20048	vacc.	4/6	2/7	6/13	2/7	3/7	5/14	11/27	53,8	64,2	59,2
20156	non-vacc.	3/6	1/5	4/11	3/5	3/5	6/10	10/21	63,6	40	52,4
Ursulesco	vacc.	0/4	3/8	3/12	2/5	3/8	5/13	8/25	75	61,5	68
Témoins	—	6/6	6/7	12/13	4/7	3/6	7/13	19/26	7,6	46,1	26,9

LÉGENDE:

Pourcentage survivants % no. 1 = survivance vis-à-vis des 2 souches invasives
Pourcentage survivants % no. 2 = survivance vis-à-vis des 2 souches faiblement invasives
Pourcentage survivants % no. 3 = survivance vis-à-vis de toutes les 4 souches.

L'analyse du tableau IX montre que des quatre souches isolées des vaccinés et non-vaccinés, la souche Ursulesco, isolée d'un vacciné s'est montrée plus immunogène que les autres. Nous avons considéré nécessaire, pour les lots d'animaux immunisés — devant être testés par inoculation sous-cutanée avec des souches faiblement invasives, — d'utiliser des doses qui permettent de les déceler dans les organes des témoins à un pourcentage proche de celui rencontré dans les tests avec 100 millions germes, fortement invasifs. Les mêmes expériences d'immunisation ont été donc répétées, en augmentant la dose des germes faiblement invasifs de 100 millions à 400 millions, cette dose correspondant (comme pourcentage d'invasion pour les témoins) à la dose de 100 millions germes invasifs. La dose intermédiaire de 250 millions ne donnant pas de résultats nettement dissemblables à ceux obtenus avec 100 millions des mêmes souches, nous avons employé la dose de 400 millions.

Les résultats sont indiqués au tableau X.

Tableau X

Souris immunisées avec différentes souches, trois inoculations sous-cutanées de 100, 100 et 200 millions germes tués, à 7 jours d'intervalle. Test vis-à-vis de souches faiblement invasives (20156, Ursulesco) inoculation sous-cutanée 100 et 400 millions germes dans la région inguinale droite. Sacrifiées après 30 et 90 minutes.

Souches vaccinantes	Provenance	Souches testées invasion												Total envahies 20156 + Ursul.		Pourcentage % survivance *) 20156 + Ursul.	
		20156						Ursulesco									
		100 millions			400 millions			100 millions			400 millions						
		30'	90'	Total	30'	90'	Total	30'	90'	Total	30'	90'	Total	100 mil.	400 mil.	100 mil.	400 mil.
20156	non-vacc.	0/3	1/3	1/6	2/3	2/3	4/6	0/3	2/3	2/6	1/3	1/3	2/6	3/12	6/12	75	50
Pana	non-vacc.	1/3	1/3	2/6	1/3	2/3	3/6	0/3	0/3	0/6	1/3	0/3	1/6	2/12	4/12	83,3	66,6
Ursulesco	vacciné	0/3	0/3	0/6	0/3	1/3	1/6	0/3	0/3	0/6	0/3	1/4	1/7	0/12	2/13	100	84,6
20048	vacciné	2/4	1/3	3/7	1/3	3/4	4/7	3/4	1/3	4/7	2/3	1/3	3/6	7/14	7/13	50	46,1
Témoins	—	2/4	2/4	4/8	3/4	3/4	6/8	1/4	3/4	4/8	3/4	3/4	6/8	8/16	12/16	50	25

*) Représente le pourcentage de survie vis-à-vis de 2 souches faiblement invasives (20156, Ursulesco).

Cette expérience prouve que la souche Ursulesco est la plus immunogène, même en utilisant la dose invasive de 400 millions germes, faiblement invasifs, correspondant à la dose fortement invasive de 100 millions germes invasifs.

Étude des caractères biologiques des diverses souches de bactéries typhiques, indifféremment de leur provenance.

Etant donné qu'il n'existe pas de différence nette entre les caractères biologiques des souches isolées des vaccinés ou non-vaccinés, nous avons recherché s'il n'y avait pas de relation entre les divers caractères biologiques de ces mêmes souches, nonobstant leur provenance (vaccinés ou non-vaccinés).

Les tableaux XI, XII et XIII présentent comparativement les caractères biologiques des souches étudiées. Le tableau XI indique la comparaison de deux caractères et les tableaux XII et XIII, de trois caractères. L'immunogénéité a été appréciée d'après les données du tableau VIII (9 souches) et les autres caractères suivant le tableau I (22 souches).

Le tableau XI présente l'étude comparative de la virulence, toxicité, invasivité, immunogénéité, prises deux par deux. Les cas où les deux tests étaient soit positifs, soit négatifs, ont été considérés comme concordants (ex.: souches virulentes et invasives ou non-virulentes et non-invasives) et comme non-concordants, ceux où un test était positif et l'autre négatif, ou vice-versa.

Tableau XI

Caractères biologiques comparés	Concordance		Discordance	
	No. absolu	Pourcent. %	No. absolu	Pourcent. %
virulence — toxicité	13	59	9	41
virulence — invasion	15	68,2	7	31,8
toxicité — invasion.....	8	36,4	14	63,6
virulence — immunogénéité.....	8	88,8	1	11,1
toxicité — immunogénéité.....	4	44,4	5	55,5
invasion — immunogénéité.....	6	66'6	3	33,3

Le tableau XI montre, en ce qui concerne la virulence, la toxicité et le pouvoir d'invasion des souches, que le pourcentage le plus élevé de concordance a été enregistré entre la virulence et le pouvoir d'invasion (68,2%). Comparant ces trois caractères à l'immunogénéité, on constate que les pourcentages de concordance les plus élevés ont été observés entre la virulence et l'immunogénéité (88,8%), et entre le pouvoir d'invasion et l'immunogénéité (66,6%). L'étude de la toxicité s'est montrée impropre au triage des souches, étant donné le pourcentage élevé de discordance avec les autres tests.

Le tableau XII montre comparativement les détails des caractères biologiques — virulence, toxicité, invasion — des 22 souches qui font l'objet de cette étude. On a noté avec + le cas où le caractère biologique respectif était bien marqué (ex.: souches invasives) et avec: — lorsque ce caractère biologique était faiblement marqué (ex.: souches faiblement invasives).

Tableau XII

Caractères biologiques			No. souches avec caractères biologiques respectifs
Virulence	Toxicité	Invasion	
+	+	+	3
−	−	−	4
+	+	−	0
−	−	+	6
+	−	−	1
−	+	+	0
+	−	+	7
−	+	−	1

Le tableau XII, ainsi que le tableau XI, montre que le plus souvent il existe une concordance entre la virulence et le caractère invasif des souches. De plus, on observe que 6 souches présentaient un pouvoir invasif marqué (+) et une faible virulence (−) vis-à-vis d'une souche avec pouvoir invasif faible (−) et virulence marquée (+), ce qui prouve l'utilité du test d'invasion dans l'appréciation de la pathogénité d'une souche de bacilles typhiques.

Tableau XIII

Caractères biologiques			No. souches avec caractères biologiques respectifs
Virulence	Invasion	Immunogénéité	
+	+	+	4
−	−	−	2
+	+	−	1
+	−	+	2
+	−	−	0
−	+	+	0
−	+	−	0
−	−	+	0

On constate du tableau XIII, un rapport étroit entre la virulence et le pouvoir d'invasion des souches, d'une part et leur immunogénéité d'autre part (concordance 8 sur 9 cas). On a observé cependant, un cas où malgré la virulence et son pouvoir d'invasion, la souche était faiblement immunogène; on n'a observé aucune souche non-virulente qui fut immunogène.

En ce qui concerne la relation entre la structure antigénique et les autres caractères biologiques, on peut déduire des tableaux II, III, IV, V et XIII, que l'on ne peut établir une corrélation entre ces facteurs. La grande majorité des souches (20 sur 22) étaient riches en antigène Vi. Néanmoins, on a rencontré des souches virulentes, ainsi que non-virulentes, toxiques et atoxiques, invasives et faiblement invasives, etc. Deux souches (Pana et Bernstein), qui agglutinaient faiblement avec le sérum « Vi » et « O » étaient virulentes et invasives.

Relation avec l'aspect clinique de la fièvre typhoïde, déterminée par les souches de bactéries typhiques respectives.

Des données très sommaires du tableau I, on peut constater une concordance entre les caractères biologiques des souches et la forme clinique de la

maladie, surtout dans les cas de formes à évolution lente, à partir desquelles on a isolé des souches virulentes, invasives et toxiques. En ce qui concerne les formes cliniques légères, on trouve souvent des cas dont on a isolé des souches très invasives, toxiques, virulentes (18071, 19205, 19025) provenant aussi bien des vaccinés que des non-vaccinés au T.A.B. La relation la plus éloignée semble exister entre la toxicité et les formes cliniques, vu que la grande majorité des formes cliniques étaient d'une sévérité moyenne et la plupart des souches isolées, atoxiques et faiblement toxiques. Ces données ont une valeur relative à cause du nombre réduit des observations, du fait que la forme clinique de maladie est redevable, pour une grande part, à d'autres facteurs: traitement aux antibiotiques après l'isolement du germe (date du début du traitement, durée) maladies associées, etc.

DISCUSSION

Les données présentées dans cette étude montrent qu'il n'y a aucune différence entre les souches de bactéries typhiques, isolées des non-vaccinés et vaccinés, en ce qui concerne leurs caractères biologiques. On trouve des souches virulentes et faiblement virulentes, toxiques et atoxiques, etc., tant chez les vaccinés que chez les non-vaccinés, à des pourcentages très rapprochés. Le fait de rencontrer des souches faiblement pathogènes aussi chez les vaccinés, montre l'importance d'autres facteurs: sous-nutrition, fatigue, maladies associées, etc., capables de diminuer la résistance de l'organisme. Néanmoins, les données épidémiologiques classiques, montrent que le pourcentage de morbidité chez les vaccinés, par rapport à celui des non-vaccinés est très réduit.

Les recherches sur l'immunogénéité active des diverses souches isolées des vaccinés ou non-vaccinés, ont donné des résultats exactement opposés à ceux présentés par l'infection des animaux immunisés par voie intrapéritonéale, ou par le test d'invasion. Un autre aspect du test d'invasion donne également lieu à la discussion de ces résultats: bien que les souches faiblement invasives aient donné, chez les témoins, un pourcentage plus réduit de souris envahies que celui des souches fortement invasives, chez les souris immunisées les résultats sont exactement contraires. (Tableau IX). Ce fait est constaté chez toutes les souris vaccinées, indifféremment de la provenance des souches (vaccinés ou non-vaccinés).

Il résulte de l'étude des caractères biologiques, que pour apprécier la pathogénité d'une souche — indifféremment de sa provenance, la détermination de la virulence et de l'invasion présente la plus grande importance. Le fait que 6 souches ont été faiblement virulentes mais invasives, nous invite à recommander aussi ce test — moins rencontré dans la littérature de spécialité — comme un test utile à l'appréciation de la pathogénité d'une souche de bactéries typhiques. Les souches les plus virulentes ont été aussi les plus immunogènes, fait également constaté par d'autres auteurs (13, 15).

Contrairement à WATSON et collab. (4) qui emploient une souche avirulente pour la production du vaccin, nous n'avons pas trouvé des souches qui soient avirulentes et en même temps immunogènes.

Pour le triage des souches en vue du test de leur immunogénéité, nous croyons que les souches avirulentes peuvent être omises de l'étude ultérieure. De même que d'autres auteurs (1, 3, 5, 13, 14, 16), nous ne constatons pas de relation entre la toxicité ou la constitution antigénique des souches et les autres caractères biologiques étudiés. Ces données diffèrent des constatations faites

par Felix dans ses travaux originaux, relativement à l'antigène « Vi ». Considérant l'ensemble de la littérature de spécialité, il paraît que la présence des deux antigènes « O » et « Vi » assure l'inclusion du plus grand nombre des souches à virulence et immunogénéité élevées (10, 12).

Ces données corroborées avec l'aspect clinique s'accordent avec l'opinion de la plupart des auteurs, surtout en ce qui concerne les formes cliniques à évolution de longue durée (11). Pour ce qui est des formes légères, nos résultats diffèrent de ceux des auteurs qui ont isolé des épidémies présentant des cas légers, des souches moins virulentes.

CONCLUSIONS

1. On n'a pu établir de corrélation entre les divers caractères biologiques des bacilles typhiques isolés des vaccinés et non-vaccinés au T.A.B. avant de contracter la maladie.

2. Entre la composition antigénique des souches et les autres caractères biologiques, il n'existe pas de relation stricte. La même conclusion concernant la toxicité.

3. Il y a une étroite relation entre la virulence, le pouvoir d'invasion et l'immunogénéité des souches.

4. Le test de la capacité agressive (invasion) représente un test utile pour l'appréciation de la pathogénité d'une souche de bactéries typhiques.

5. Dans les cas de fièvre typhoïde à évolution de longue durée, on rencontre, le plus souvent, des souches à virulence et pouvoir d'invasion élevés.

BIBLIOGRAPHIE

1. di Aichelburg U. et Montagnini L. — Giorn. di Batter. i Immun., 1937, **19**, 190. (réf. Zblt. f. Bakt., 1938, **128**, 150).
2. Arjelas L. K. et Zeitlenok M. A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1955, No. 8, 46.
3. Arjelas L. K. et Zeitlenok M. A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1956, No. 1, 13.
4. Batson H. C. et coll. — Publ. Health Rep., 1949, **64**, 671.
5. Batson H. C., Landy M. et Brown M. — J. exp. Med., 1950, **91**, 219.
6. Berman V. M. — Izd. Akad. Med. Nauk, SSSR, Moscou, 1948.
7. Berman V. M. et Slavskaia E. M. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1945, No. 10—11.
8. Felix A. et Pitt M. — The Lancet, 1934, **227**, 1.
9. Felix A. et Anderson E. S. — J. Hyg., 1951. **49**, 349.
10. Felix A. et Pitt M. — J. Hyg., 1951. **49**, 92.
11. Findlay H. — J. Hyg., 1951. **49**, 111.
12. jude A. et Nicolle P. — C.R. Acad. Sc., 1954. **238**, 2362.
13. Nicolesco. M. — Arch. Roum. de Path, exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 54.
14. Rauss K. — Zt. f. Immunitätsforsch., 1939. **97**, 365.
15. Siller J. F. — Am. J. Publ. Health, 1936. **26**, 219.
16. Tolnay G., Vaczi L. et Barsy G. — Acta Microbiol., Acad. Sc. Hung., 1956. 3, 353

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТИФОЗНЫХ ПАЛОЧЕК, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БРЮШНОТИФОЗНЫХ БОЛЬНЫХ, ПРИВИТЫХ ИЛИ НЕ ПРИВИТЫХ ПРОТИВОТИФОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучались биологические признаки 14 штаммов тифозной палочки, выделенных от брюшнотифозных больных не привитых против брюшного тифа и 8 штаммов тифозной палочки, выделенных от больных, привитых тифозно-паратифозной вакциной перед

заболеванием. Определяли: тип по бактериофагу, агглютинируемость с сыворотками « о » и «Vi», вирулентность, токсичность, агрессивность, иммуногенность. Не удалось установить наличие связи между разными биологическими признаками штаммов, выделенных у указанных двух категорий больных. Исследования, проведенные для выявления возможной связи между разными свойствами того же штамма, безразлично какого происхождения (от привитых или не привитых) дали возможность установить наличие тесной связи между вирулент ностью, инвазивными свойствами и иммуногенностью штаммов. Не установлено наличие тесной связи между антигенным составом, токсичностью штаммов и остальными биологическими свойствами.

Определение способности к агрессии может служить в качестве теста приемлемого для оценки патогенности штамма тифозной палочки. При долго длившихся заболеваниях брюшным тифом встречались довольно часто штаммы с высокой вирулентностью и инвазивностью.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BIOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN VON TYPHUSBAZILLEN, DIE VON MIT T.A.B. GEIMPFTEN UND VON NICHT GEIMPFTEN TYPHUSKRANKEN ISOLIERT WURDEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die biologischen Eigenschaften von 14 Typhusbazillenstämmen untersucht, die von nicht mit T.A.B. geimpften Typhuskranken isoliert worden waren, sowie von 8 Typhusbazillenstämmen, die von vor der Erkrankung mit T.A.B. geimpften Patienten stammten. Die Untersuchung betraf: den Bakteriophagentypus, die Agglutinierbarkeit durch „O" und „Vi"-Sera, die Virulenz, die Toxizität, die Aggressivität, die Immunogenität. Zwischen den verschiedenen biologischen Merkmalen und dem Ursprung von einer der beiden obigen Kategorien von Kranken konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Bei der Untersuchung eventueller Beziehungen zwischen den verschiedenen Eigenschaften der gleichen Stämme, unabhängig von ihrer Abstammung (geimpfte oder nicht geimpfte Personen), ergab sich, dass zwischen der Virulenz (Invasivität) und Immunogenität der Stämme ein enger Zusammenhang besteht. Keine engere Beziehung besteht zwischen der Antigenstruktur und der Toxizität der Stämme und den anderen biologischen Merkmalen.

Die Prüfung der Aggresivität stellt ein wertvolles Mittel zur Abschätzung der Pathogenität eines Typhusstammes dar. In Fällen von sich lange hinziehendem Typhus wurden meistens Stämme von hoher Virulenz und Invasivität vorgefunden.

A STUDY OF THE BIOLOGICAL CHARACTERS OF TYPHOID BACILLI ISOLATED FROM TAB-VACCINATED AND NON-VACCINATED TYPHOID FEVER PATIENTS

SUMMARY

Fourteen strains of typhoid bacilli isolated from typhoid fever patients which had not undergone TAB vaccination and 8 strains of typhoid bacilli isolated from patients vaccinated with TAB at some time before the disease were investigated. The determinations concerned: the bacteriophage type, agglutinability by „O" and „Vi" sera, virulence, toxicity, aggressiveness, and immunogenicity. No relation was found to exist between the origin of the strains from one or the other of the two groups of patients and their various biological characters. An investigation of possible relations between the various biological properties of the same strains, irrespective of their origin (vaccinated or non-vaccinated subjects), showed a close relationship to exist between the virulence (invasiveness) and the immunogenicity of the strains. No close relationship is demonstrable between the antigenic structure and toxicity of the strains and their other biological characters.

Testing of aggressiveness affords a useful method for the estimation of the pathogenicity of a typhoid strain. In most cases of protracted typhoid fever the strains isolated displayed a high degree of virulence and invasiveness.

OBSERVATIONS SUR LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE ET L'ÉTIO-PATHOGÉNIE DE L'ACTINOMYCOSE. ÉTUDE DE CERTAINES SOUCHES D'ACTINOMYCÈTES PATHOGÈNES ISOLÉES CHEZ L'HOMME.

par

C. G. BĂCANU

(Travail de la Clinique chirurgicale buco-maxilo-faciale de la Faculté de Stomatologie de Bucarest et de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)

— Manuscrit reçu le 21 février 1959 —

Dans le présent travail, nous exposons nos observations sur le diagnostic de laboratoire de l'actinomycose et sur l'étude de 6 souches d'actinomycètes isolées des malades avec actinomycose cervico-faciale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. *Récolte du produit pathologique:* identification macroscopique des formations caractéristiques — grains d'actinomycose.

Dans les formes tumorales de l'actinomycose, on procède à l'extirpation totale du mycétome; on pratique des sections et on récolte les grains des petits abcès.

Dans les formes abcédentes, la récolte se fait: 1) de l'abcès fistulisé — par pression —; 2) par ponction à l'aide d'une grosse aiguille ou d'un trocart adapté à la seringue; 3) et par intervention chirurgicale de l'abcès (désinfection préalable de la zone, généralement à l'alcool, anesthésie de la région par infiltration de novocaïne ou réfrigération par chlorure d'éthyl (kelen)). Pour les malades avec un psychique labile, on fait une anesthésie générale. L'abcès fluctuant est incisé dans la région déclive où s'accumulent les grains, on exprime le contenu purulent et on le récolte sur coton hydrophile ou gaze stérile. On examine le pus jusqu'à la découverte des grains actinomycosiques.

Résultats. Dans les formes tumorales, la mise en évidence des grains est possible lorsque les abcès sont visibles. Dans les formes abcédentes, la récolte des grains de la fistule et par ponction est difficile. La méthode qui donne les meilleurs résultats (100%environ) est l'intervention chirurgicale qui doit être pratiquée à un stade peu avancé de ramolissement (quelques jours avant l'ouverture spontanée) au moment où la zone de fluctuation ne comprend pas l'abcès en entier et la peau est encore intacte. Dans ce stade, les grains apparaissent généralement mêlés au pus, d'une couleur blanc-jaunâtre, de dimensions inégales, le plus souvent de la grandeur de la tête d'une épingle.

Dans les formes d'actinomycose infiltrative, scléreuse, avec une large zone rouge-violacée (formes anciennes) le pus se trouve en quantité réduite, avec prédominance du sang, les grains sont peu nombreux, parfois absents, et facilement décelables, contrastant avec la couleur du sang. Leurs dimensions sont

plutôt égales, de forme sphérique régulière, assez durs, contrastant des conglomérés microbiens ou détritus cellulaires. Leur consistance est particulièrement dure parfois, (ainsi à l'incision d'un abcès gingival chez un bovidé à paradentose, les grains étaient d'une dureté calcareuse) à cause de leur capacité de fixer le calcium (1), (2). Dans l'actinomycose avec des souches qui fixent faiblement ou pas du tout le calcium, la consistance des grains est due au feutrage des filaments qui sont d'autant plus liés entre eux qu'ils sont jeunes et non-fragmentés; elle peut être également due à l'étroite liaison des massues disposées à la périphérie des grains. Lorsque les souches ont une tendance à s'autolyser par vieillissement,(4) les grains sont absents ou en petite quantité. Dans ces cas, les abcès, contrairement à ceux provoqués par les souches fixatrices de calcium, se trouvent sous tension, grâce à la grande quantité de pus.

Identification des grains par microscopie. Les grains récoltés avec l'anse en platine, mélangés à une goutte de glycérine entre lame et lamelle sont paraffinés; les préparés peuvent être conservés 1 à 2 ans selon le degré de consistance des grains.

Examinés au microscope, les grains semblent formés d'une masse centrale, dans laquelle avec un objectif plus grand on peut distinguer le vague dessein des filaments et à la périphérie, disposées radiairement (actino) les formations caractéristiques connues sous le nom de massues. Le grain est entouré des polymorphonucléaires et hématies, la prédominance des uns ou des autres dépendant de la quantité de pus ou de sang.

Les grains présentent 4 formes: a) circulaire ou ovalaire, massues radiairement disposées, dont le diamètre médian et longitudinal est inégal (fig. 1); b) ovalaire, massues de dimensions égales, rappelant une palissade (fig. 2); c) lobulée, (massues semblables à la fig. 2) avec des massues discontinues et apparition de vagues filaments avec tendance à former des pédicules (fig. 3); d) grains composés de plusieurs formations individualisées; par vieillissement, ils se fragmentent et donnent naissance à 4-5 grains (fig. 4).

Identification microscopique des Actinomycètes. Pour l'examen microscopique des frottis secs, on écrase les grains sur lame; le préparé est fixé à la flamme

Fig.1

Fig.2

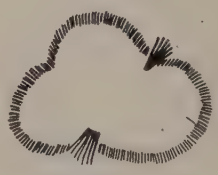


Fig.3

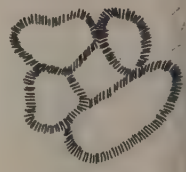


Fig.4

ou de préférence à l'alcool 96°. On procède aux colorations Gram et Ziehl Neelsen.

Résultats. Par coloration Gram on observe sur les frottis une grande quantité de polymorphonucléaires, hématies et actinomycètes Gram-positifs. Le polymorphisme de ces derniers va de petits et rares filaments jusqu'aux bacilles et cocci. On constate en même temps des différences de coloration. Les bacilles disposés en groupe, aux extrémités tantôt renflées, tantôt effilées, sont de longueur inégale. Les cocci, disposés en groupe, se distinguent des autres espèces de cocci par leurs dimensions inégales et leur affinité tinctoriale variée. L'âge du grain

et le spécifique de la souche sont les causes de la prédominance, soit des bacilles, soit des cocci. Sur les frottis à produits pathologiques, provenant des cas d'actinomycose, provoqués par les souches auto-lytiques (4), souvent les actinomycètes ne peuvent être mis en évidence. Il est nécessaire dans ces cas, que le nombre de préparés examinés soit aussi grand que possible, afin de trouver une formation qui ne soit pas lysée. Sur les frottis des abcès incisés, on a très rarement constaté des microbes d'association. Parmi les cas diagnostiqués dans la clinique, on n'a jamais mis en évidence un actinomycète acido-résistant. Sur les frottis des fistules, on constate souvent, à part les actinomycètes, une flore microbienne associée (infection sur-ajoutée).

Isolement, récolte et conservation des actinomycètes. Pour l'isolement des actinomycètes on a utilisé le milieu de Pai, (5) fraîchement préparé (24 à 48 h.) L'ensemencement se fait pendant l'intervention chirurgicale, avec l'anse de platine, en prélevant la plus grande quantité possible (5 à 10 grains) de grumeaux intacts, à la proximité du liquide de condensation sur 2 tubes. Un des tubes est paraffiné à fin d'empêcher l'évaporation du milieu, l'autre tube est placé dans un exsiccateur, dont l'air a été remplacé par le CO_2 (6). Les tubes paraffinés sont inclinés journellement pour humecter la surface du milieu et maintenus à 37° pendant 30 jours.

Une fois développés sur le milieu de Pai (le milieu additionné d'oeuf, représentant le milieu de choix pour les actinomycètes) les grains peuvent être cultivés facilement sur milieu hydrocarbonné (glucose, spécialement glucose brute). Les colonies adhérentes au milieu et de consistance dure, sont raclées avec l'anse, déposées sur la surface du nouveau milieu, écrasées et étendues sur une surface aussi grande que possible. Dans les milieux liquides, l'écrasement des colonies se fait sur la paroi du tube. Les souches sont conservées par passages hébdomadaires sur le milieu de Pai.

Résultats. Après une incubation de 3 à 10 jours à 37°, la majorité des souches se sont développées. Les tubes où on n'a pas observé l'apparition des colonies, pendant cet intervalle, sont maintenus jusqu'au 30-e jour, vu que certaines souches se développent très lentement. Dans l'atmosphère de CO_2 avec un minimum d'air, quelques souches se développent plus rapidement, les colonies étant plus grandes. Au niveau de l'ensemencement des grains on observe un godet avec une zone accentuée de protéolyse autour des colonies. Dans les sous-cultures, la zone de protéolyse n'apparaît que si les souches sont protéolytiques. Le développement des actinomycètes se produit également dans le liquide de condensation, néanmoins leur croissance massive s'observe dans la zone située immédiatement au-dessus du liquide de condensation.

L'isolement des actinomycètes a réussi dans une proportion de 60—70% des malades étudiés. Seulement 30—40% des souches isolées (dans des conditions identiques) se sont développées en sous-cultures, la grande majorité s'est perdue lors de la première ou seconde sous-culture. De la totalité des grains ensemencés dans le même tube, seulement 20—30% donnent des colonies. L'ensemencement des grains doit être fait pendant l'incision de l'abcès; ceux effectués quelques heures après la récolte du produit pathologique donnent des résultats négatifs. (7).

Des abcès actinomycosiques à différents stades évolutifs, ouverts chirurgicalement avec toutes les mesures d'asepsie, on a obtenu dans la presque totalité des cas des cultures pures d'actinomycètes. En cas d'isolement négatif, les ensemencements doivent être répétés.

La température optime de développement est de 37°C; à une température inférieure (18°) les actinomycètes ne se développent plus. Les souches qui, par passages répétés et réguliers, ont vécu pendant 2—3 mois, se sont conservées pendant des années.

La température de conservation optime est de 25°. A cette température, les colonies ont continué à progresser et on a pu faire des sous-cultures à plusieurs mois d'intervalle.

Les actinomycètes conservés à + 4° sur milieu solide ne se sont pas développés au cours des passages suivants. On n'a pas obtenu des sous-cultures en partant des passages sur milieu liquide.

II. *Etude des souches isolées.* Les caractères culturels et morphologiques ont été étudiés sur les souches: S.P.; G.M.; S.I.; J.M.; S.G.; et P.I., isolées de 6 malades hospitalisés. Deux de ces souches (G.M. et S.P.) se rapprochent du genre Nocardia et les 4 autres du genre Actinomyces (Bergey, 1956).

Les souches ensemencées sur divers milieux, en anaérobiose relative (6) (microaérophilie avec CO_2) présentent des différences quant à leur évolution (tableau I).

Tableau I

Souche	S. P.		G. M.		S. .I.		J.N.		S.G.		P.I.	
	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2	Aérobiose	Microaérophilie avec CO_2
Gélose . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gélose lactosée . . .	+	+++	++	+++	+	+++	+	+++	++	++++	+	+++
Gélose sang.	—	—	±	±	—	—	—	—	±	±	—	—
Bouillon glucosé + sérum 1/3 .	+	++	++	+++	—	+	—	+	+++	+++	+	++
Milieu de Pai	++	+++	++++	++++	+	+++	+	+++	++++	++++	+	+++
Pomme de terre glycérinée . .	—	+	+	++	—	—	—	—	±	++	—	—
Bouillon . .	—		—		—		—		—		—	
Bouillon glucosé . . .	++++		++++		++++		++++		++++		++++	
Gélose Veillon . . .	+++ r		++++		++++		++++		++++		++++	
Gélatine . .	—		+		—		—		—		—	
Bile	—		—		—		—		—		—	
Lait	ne coagule pas											
Eau peptonnée . . .	—		±		—		—		—		—	
Eau pept. glucosée 1%	+++		+++		+++		+++		+++		+++	

A l'exception des souches G.M. et S.G. qui se sont faiblement développées sur gélose-sang et gélatine, les autres colonies ne se sont pas développées sur: bouillon, gélose, bile, lait, eau peptonnée, gélose-sang et gélatine. Sur milieu avec œuf ou sucre, toutes ont donné des cultures abondantes. Les souches S.P., S.I., G.M. et P.I. poussent abondamment sur milieu solide dans l'atmosphère de CO_2, tandis que dans des conditions d'aérobiose, leur développement est beaucoup moins intense, pouvant être considérées comme souches anaérobies et facultativement aérobies. Les souches G.M. et S.G. se développent aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose, pouvant être considérées comme des souches aéro-anaérobies. Des 6 souches contrôlées, 5 sont blanches, seule la souche G.M. est pigmentée en jaune.

Les colonies développées sur milieu solide (surtout milieu de Pai) sont proéminentes, rugueuses, en forme de chou-fleur, de consistance dure et adhérentes au milieu. Les souches G.M. et S.G. n'adhèrent pas au milieu. La souche G.M. est protéolytique. Les colonies de la proximité du liquide de condensation sont généralement plus abondantes et plus grandes, se développant cependant aussi dans le liquide de condensation sous forme de grumeaux, parfois, non-adhérents. Les colonies des souches G.M. et S.G., contrairement aux autres sont non-consistantes. La souche S.G. a donné des cultures similaires à celles du B. tuberculeux, présentant parfois un reflet métallique, pareil à celui des B. typhiques, développés sur milieu Wilson-Blair. Sur milieu Lœffler, la souche G.M. a produit des grumeaux, détachés du milieu et qui roulent le long de la surface du milieu lorqu'on incline le tube. Les souches G.M. et S.G. se développent très faiblement sur gélose-sang et ne sont pas hémolytiques. Toutes les souches ensemencées sur bouillon glucosé, se développent en grumeaux, très rarement en masse ou en nappe. Le développement se fait au fond du tube, le reste du milieu restant clair. Souvent les grumeaux de dimensions plus petites, adhèrent aux parois du tube, cette adhérence étant si forte que parfois ils ne se détachent pas même après agitation du tube. En gélose Veillon, le développement se produit sur tout le milieu, avec formation de grumeaux pareils à ceux obtenus sur bouillon glucosé. Les Actinomycètes se développent plus abondamment sur milieu liquide; en introduisant des perles en verre et en agitant le milieu chaque jour (pour fragmentation), on obtient des récoltes 4 à 5 fois plus riches.

Le pH optime est égal à 7,4; les limites de développement des souches étudiées ont été comprises entre pH 6—8,6 comme suit:

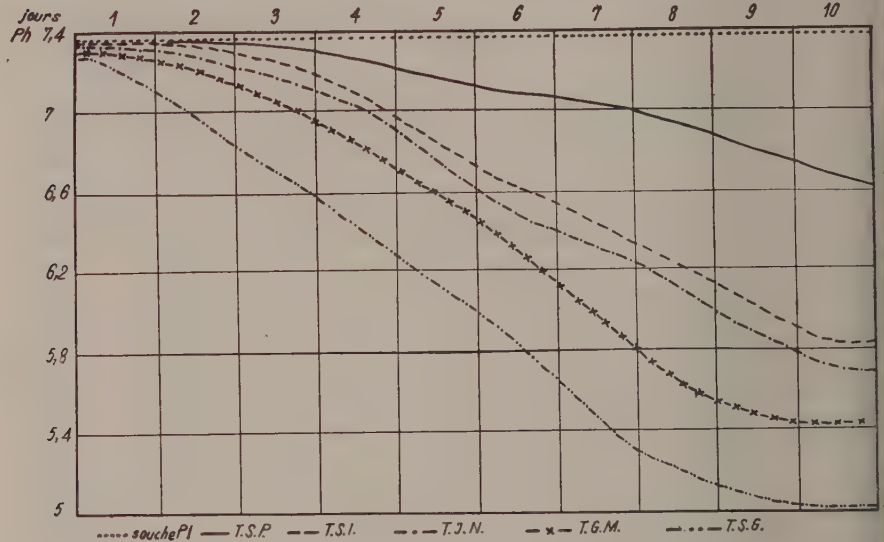
Souche S.P. entre 7—8,6	Souche J.N. entre 6—8
Souche G.M. entre 7—8	Souche S.G. entre 6—8,6
Souche S.I. entre 6,5—8	Souche P.I. entre 6,5—8

Le pH du bouillon glucosé diminue, chez la majorité des souches, dans l'intervalle de 10 jours de 7,4 à 5 (souche S.G.), à l'exception de la souche P.I. chez laquelle on n'a pas observé une diminution du pH (graphique 1).

Dans le préparé frais, entre lame et lamelle, les grumeaux développés sur milieu liquide apparaissent comme un feutrage de filaments, aux extrémités libres et zones de réfringence plus ou moins accentuées.

Les actinomycètes sont immobiles, Gram-positifs, d'intensité tinctoriale différente. Les frottis des cultures en bouillon glucosé, coloration Gram, perdent leur intensité tinctoriale par une décoloration prolongée, fait remarqué chez les formes en bâton ou coques, les formes filamenteuses gardant le Gram même

à la suite d'une décoloration prolongée. Dans les frottis avec actinomycètes sur milieu solide, les formes de bacilles et coques prédominent, les filaments étant très rares. Les bâtons présentent souvent des renflements terminaux, rappelant le B. diphtérique; d'ailleurs le polymorphisme des actinomycètes ressemble à celui des B. diphtériques. Sur les frottis d'actinomycètes cultivés en bouillon glucosé, les filaments prédominent; les plus anciens sont en voie de sectionnement



Graphique 1 — Variations du pH — dans les cultures de bouillon glucosé

(condensation de l'endoplasme), à aspect de streptocoques très longs. La souche G.M. présente parfois des bâtonnets, aux extrémités arrondies; dans les frottis de cultures sur milieu Lœffler, elle se présente sous forme de cocci, les uns plus grands et plus fortement colorés, les autres plus petits et moins colorés. Toutes les colonies se colorent au bleu de méthylène, May-Grünwald-Giemsa; elles ne sont pas acido-résistantes.

Caractères biochimiques

Réaction au rouge de méthyl . . . . .négative avec toutes les souches
Réaction à l'indol . . . . . .négative avec toutes les souches
Réaction Voges-Proskauer . . . . . .négative avec toutes les souches

La réaction pour H_2S a été positive avec la souche G.M. et fortement positive avec la souche S.G. (souche aérobie); les anaérobies produisant peu de H_2S et seulement dans les cultures âgées de 2—3 mois.

Fermentation des sucres. Les souches ont été ensemencées en eau peptonnée tournesolée, additionnée de 1% sucres respectifs. La lecture des résultats a été faite généralement après 10 à 25 jours d'incubation à 37°, notant de + à ++++ l'intensité de la fermentation. Pour les souches avec un maximum

d'intensité (++++), apparue avant 10 jours, on a noté le jour respectif (tableau II).

Les 6 souches se distinguent du point de vue fermentation des sucres. (tableau II).

Action de la chaleur. Les actinomycètes sont détruits à 60° environ, en 60 minutes, à 65° en 35 minutes et à 75° en 15 minutes. Séchés à la température de la chambre (25°) ils meurent environ en 2 heures.

Inoculés à la souris, cobaye et lapin par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse et intrapéritonéale, ils ne provoquent pas la maladie. Les filtrats cultivés en bouillon glucosé 1‰ ne sont pas toxiques pour ces animaux inoculés par les mêmes voies. Inoculés par voie intradermique aux malades à actinomycose, ces filtrats provoquent souvent des réactions positives.

DISCUSSION

Ce travail comprend 2 parties:

1. une dans laquelle sont exposées les considérations générales sur le diagnostic de laboratoire; dans la majorité des cas on a pu mettre en évidence les actinomycètes par examens directs répétés;

2. l'autre partie représente l'étude de 6 souches isolées et conservées sur des milieux de culture.

La présence chez un malade de multiples procès suppuratifs, qui fistulisent et se répètent, avec grains caractéristiques décelables dans le pus, et présence dans les frottis d'éléments filamenteux, bacillaires ou coccoïdes, de forme irrégulière et de taille inégale, Gram-positifs à différents degrés, nous permet d'affirmer avec une quasi-certitude qu'il s'agit d'une actinomycose. Dans ce cas, le traitement s'impose dès le début, évitant au malade des métastases dans des régions inaccessibles, qui aggravent le pronostic.

Lorsque par la méthode Ziehl-Neelsen on constate la présence de bacilles acido-résistants, il est indispensable de procéder à des cultures sur milieux spéciaux et inoculations aux cobayes, afin d'établir le diagnostic différentiel avec la tuberculose.

Dans les cas où les grains n'ont pas été mis en évidence, ne décelant sur les frottis que des leucocytes, avec absence de tout élément microbien, 4 hypothèses sont possibles.

1. Récolte défectueuse du produit pathologique (incision dans la région supérieure de l'abcès), cas d'actinomycoses généralement produits par la souche fixatrice de calcium, les grains tombant dans la partie déclive.

2. Ouverture de l'abcès effectuée à un stade avancé; les actinomycètes s'autolysant (actinomycose avec souches auto-lytiques) (4).

3. Région infectée, due à d'autres causes que celle des actinomycètes.

4. Abcès dû à un corps étranger, entretenant la suppuration.

Les grains sont des formations qui représentent l'unité microbienne, laquelle une fois installée dans l'organisme, se développe et arrive à la maturité. Les grains lobulés, résultent de plusieurs unités microbiennes, chaque lobe représentant une unité à part. Dans ce cas, les unités microbiennes pendant leur développement dans l'organisme étant rapprochées, les filaments voisins fusionnent, les massues restant à la périphérie (fig. 3). Quand la distance entre les unités microbiennes, en plein développement est plus grande, elles forment au moment de leur maturité des massues tout autour, étroitement liées entre

Tableau

Souche	Jours	Glucose	Lactose	Manose	Maltose	Saccharose	Galactose	Arabinose
S.P.	10	+	—	—	++++ 7 jours	—	—	—
	25	++++	—	++++	++++	—	++	—
G.M.	10	++++ 5 jours	—	±	—	+++ 3 jours	+++ 7 jours	—
	25	++++	++	++++	++	+++	+++	—
S.I.	10	++++ 3 jours	—	—	++++ 4 jours	—	—	—
	25	++++	+	++	++++	—	±	++++
I.N.	10	++++ 3 jours	—	—	++++ 5 jours	—	±	—
	25	++++	++	—	++++	—	+++	++++
S.G.	10	++++ 3 jours	++++ 3 jours	++++ 2 jours	++++ 3 jours	++++ 3 jours	+++ 3 jours	++++ 10 jours
	25	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
P.I.	10	—	—	—	++++ 4 jours	++++ 4 jours	—	—
	25	—	++	—	++++	++++	++	++++

elles (conglomeré rappelant le chou-fleur), de manière à ce que macroscopiquemen elles se présentent comme un grain unique, mais qui dépasse la taille habituell (fig. 4).

Le développement du grain « in vivo » est similaire à celui « in vitro », présen tant en plus la couche de massues.

La formation des massues « in vivo » est à notre avis un simple phénomèn mécanique dû au développement du grain dans une cavité close. L'évolutio des actinomycètes le long du tractus digestif, où les grains ne forment pas d massues, semble confirmer cette hypothèse. Dans les poches gingivales de l paradentose, qui sont également des cavités ouvertes, nous avons constaté souven la présence de grains non-massués, formés uniquement par le feutrage de fila ments actinomycosiques. Nous supposons que ce phénomène pourrait être d aussi à la pression exercée par la mastication ainsi qu'il se passe dans le cas de fistules, qui sont des cavités ouvertes. Lorsque la métastase microbienne es localisée dans le tissu de la proximité de la fistule, le développement a lieu dan la cavité close formant des grains massués. Le processus pathologique actino mycosique poursuivant son cours habituel, abcède dans la cavité la plus proch (fistule), les grains étant éliminés de cette manière à l'extérieur.

II

Lévulose	Xylose	Inosite	Rhamnose	Manite	Dulcite	Inuline	Sorbite	Salicine
++++ 5 jours	—	—	—	—	—	±	—	—
++++	+	—	—	—	—	+	++	++
+++ 7 jours	—	—	—	—	—	++++ 3 jours	—	—
+++	++	+	++	—	++	++++	++	—
+++ 6 jours	—	—	—	—	—	—	—	—
+++	+++	++	+	++	++	+++	+	++
±	—	—	—	—	—	—	±	—
++	+++	±	++++	—	±	+++	+	++
+++ 3 jours	—	—	++++ 10 jours	—	++++ 4 jours	++++ 3 jours	—	+++ 3 jours
+++	+++	++	++++	+	++++	++++	—	+++
—	—	—	—	—	—	±	—	—
++	+++	+	+++	+	—	++++	±	±

En ce qui concerne la culture des actinomycètes, aussi bien l'isolement que les passages ultérieurs pour leur conservation, l'ensemencement doit être effectué sur un très grand nombre de tubes et avec la plus grande quantité de grains possibles. Tenant compte de la résistance minime de ces derniers à la déssiccation, nous avons trouvé nécessaire, ce qui d'ailleurs a été confirmé par la pratique, que le milieu de culture doit être frais, ensemencé de grains intacts et humecté journellement avec le liquide de condensation.

Un fait important est celui du développement lent des actinomycètes, c'est pourquoi les tubes ensemencés pour l'isolement du germe, doivent être maintenus jusqu'à 30 jours. Dans un seul cas, la souche s'est développée après 30 jours.

L'affirmation de certains auteurs (8) qui considèrent l'actinomycose comme une maladie d'association microbienne obligatoire (surtout à germes pyogènes), n'a pas été confirmée. Tant que parmi les différents groupes microbiens il n'existe pas d'antagonisme, leur coexistence demeure possible. Attendu qu'il s'agit d'une maladie qui se propage par une solution de continuité, au niveau du tractus digestif dans lequel aussi d'autres espèces microbiennes peuvent pénétrer, un procès de compétition a lieu. Le germe le plus adaptable et le plus agressif est celui qui produira la maladie respective. La rareté des cas d'actinomycose, en

rapport avec la fréquence des solutions de continuité du niveau du tractus digestif (extraction de dents, infection dentaire, plaies buccales, extraction des amygdales, etc.) prouvent que les souches d'actinomycètes sont dans la majorité des cas apathogènes ou faiblement pathogènes. L'actinomycose devrait être beaucoup plus fréquente si les actinomycètes nécessitaient une association avec les germes pyogènes. Sur les frottis, aussi bien que sur le milieu de culture (de Pai) par incision chirurgicale des abcès, effectuée avec toutes les mesures d'asepsie, on n'a constaté que dans 2 sur 30 cas la présence des germes sur-ajoutés. Dans les cas, où, à part des actinomycètes, on a trouvé aussi d'autres germes, nous supposons que ces derniers ne représentent qu'une infection sur-ajoutée.

Ainsi dans l'angine Plaut-Vincent, pour la plupart des cas, à côté des fusospirilles se trouvent aussi d'autres germes (les cas où on ne trouve que des fusispirilles étant rares); néanmoins, aucun auteur n'a attribué l'angine Plaut-Vincent à une association entre les fusospirilles et les autres germes.

D'autre part, il est bien connu que des actinomycoses peuvent être transmises aux animaux de laboratoire, lorsque on inocule des actinomycètes dans les abcès pré-existants, dus soit aux germes pyogènes, soit à des corps étrangers (abcès stériles). Ce fait montre que dans l'apparition de l'actinomycose, les facteurs locaux (traumatisme) sont beaucoup plus importants que les facteurs généraux. Un des facteurs favorisant pourrait être la réduction de la quantité d'oxygène (pour les souches anaérobies) au niveau du micro-abcès, bien que celle-ci semble redevable en premier lieu aux modifications physio-pathologiques du niveau du tissu, et seulement en second lieu à la consommation de l'oxygène par les germes sur-ajoutés.

Quant à l'affirmation (8) que les actinomycètes se développent mieux en milieu acide, notre étude nous a démontré que le pH le plus favorable au développement des souches isolées oscillait autour de 7,5. La baisse du pH « in vivo » et « in vitro » expliquerait la difficulté d'isolement des actinomycètes et l'impossibilité de leur conservation en milieu liquide.

L'étude des caractères morphologiques, culturels et biochimiques a montré de grandes différences entre les souches, différences également constatées dans les aspects et l'évolution clinique de la maladie.

Le fait que les actinomycètes sont rapidement détruits par dessiccation et sont faiblement pathogènes, semble expliquer l'incidence réduite et la transmission pratiquement presque nulle de cette affection, malgré le nombre élevé de solutions de continuité du niveau du tractus digestif.

Néanmoins, les données obtenues par nos recherches sur la paradentose (lesquelles doivent être continuées et complétées) nous font supposer que les actinomycètes jouent un rôle principal dans l'étio-pathogénie de cette maladie.

CONCLUSIONS

Le diagnostic de laboratoire des actinomycètes par dépistage des grains, est relativement facile à établir.

L'isolement et l'entretien des souches est laborieux.

Des 6 souches étudiées, deux se rapprochent du genre *Nocardia*, les autres des *Actinomyces*, (Bergey 1956).

Aucune des 6 souches ne présente des caractères identiques, ce qui concorde avec le fait classique que les actinomycètes pathogènes présentent en tous points de grandes différences entre eux, ce qui a mené à la description et communication

de chaque cas d'actinomycose, respectivement de chaque souche. A cause de cette grande variabilité, les actinomycètes ont été désignés dans la littérature sous un grand nombre de dénominations ce qui rend particulièrement difficile leur classification.

BIBLIOGRAPHIE

1. Krasilnikov — Isacenko (1948) (voir Tauson) — Mikrobiologhia, 1950, **16,** 55.
2. Rubencik (1948) (voir Tauson) — Mikrobiologhia, 1950, **19,** 557.
3. Krasilnikov N. A. — Manuel pour la détermination des bactéries et Actinomycètes
4. Rabakov A. I. — Soviet. Med. 1950, No. 7. 16.
5. Pai — Chinese Med. J., 1932, **46,** 1203; Journ. Infect. Dis. 1936, **59,** 22.
6. Magnusson H. — Acta Path. et Microbiol. Scand., 1928. **5,** 170.
7. Paulian E. D. — Spitalul, 1911, **31,** 25.
8. Vendeg V. — Chirurgia, 1952. **2,** 45.

К ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ЭТИОПАТОГЕНЕЗУ АКТИНОМИКОЗА. ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ЧЕЛОВЕКА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Приводятся показания для взятия патологического материала и в отношении способов микроскопической идентификации актиномицетов.

Для выделения, культивирования и хранения рекомендуется среда Пай, на которой большинство актиномицетов растет после инкубации в 3 — 10 дней при 37°С.

Изучаются 6 штаммов актиномицетов, выделенные у больных, находящихся в клинике, и описываются общие признаки и индивидуальные особенности.

Лабораторная диагностика актиномикоза легко осуществима, затруднительной является изоляция и сохранение актиномицетов. Часть изученных штаммов приближается к роду *Nocardia*, другие-к роду *Actinomyces*.

Отмечено, что среди изучаемых шраммов не обнаружен ни один штамм, который был-бы идентичен другому.

BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE LABORATORIUMSDIAGNOSE UND DIE AETIOPATHOGENESE DER AKTINOMYKOSE. UNTERSUCHUNG EINIGER VOM MENSCHEN ISOLIERTER AKTINOMYZETENSTÄMME.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Hinweise betreffs der Gewinnung pathologischen Materials und der Methoden zur mikroskopischen Identifizierung der Aktinomyzeten gegeben.

Für die Isolierung, Züchtung und Erhaltung, ist Pais Nährboden zu empfehlen, auf welchem die Mehrzahl der Aktinomyzeten nach 3—10-tägiger Inkubation bei 37°C wachsen.

Sechs, von in die Klinik eingelieferten Kranken isolierte, Aktinomyzetenstämme werden studiert und ihre gemeinsamen Eigenschaften, sowie ihre individuellen Besonderheiten beschrieben.

Die Laboratoriumsdiagnose der Aktinomykose ist leicht, Schwierigkeiten bieten jedoch die Isolierung und Aufbewahrung der Aktinomyzeten. Ein Teil der untersuchten Stämme stehen dem Genus *Nocardia* nahe, andere mehr dem Genus *Actinomyces*. Es wird hervorgehoben, dass von den untersuchten Stämmen keine zwei miteinander identisch waren.

OBSERVATIONS ON THE LABORATORY DIAGNOSIS AND AETIOPATHOGENESIS OF ACTINOMYCOSIS. A STUDY OF SOME ACTINOMYCES STRAINS ISOLATED FROM HUMAN SUBJECTS.

SUMMARY

Some indications are given concerning the collection of pathological material and the methods used in the microscopic identification of actinomycetes.

Pai's medium is recommended for isolation, cultivation, and preservation. Most actinomycetes grow readily on this medium after an incubation of 3 to 10 days at 37° C.

Six strains of actinomycetes isolated from patients admitted to the clinic are studied, and their common and particular individual characteristics are described.

The laboratory diagnosis of actinomycosis is easily made, while isolation and preservation of actinomycetes meets with certain difficulties. Some of the investigated strains resemble the genus *Nocardia* and others the genus *Actinomyces*. It is noteworthy that among the strains investigated there were no two identical ones.

ÉTUDE DE QUELQUES SOUCHES DE *S. CHOLERAE SUIS* CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE FACTEURS AVEC ACTION ANTIMICROBIENNE

par

Léonie Mintzer

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des produits biologiques)

— Manuscrit reçu le 18 novembre 1959 —

L'obtention des souches atténuées et immunogènes, à l'usage de la médecine humaine ou vétérinaire, a été l'objet de nombreuses recherches. (1), (2), (3), (4), (5), (6), (15). Leur emploi à la préparation des vaccins vivants anti-tuberculeux, tularémiques, brucelliques, etc., a présenté l'avantage de permettre le contrôle préalable de l'immunogénéité sur des animaux de laboratoire sensibles aux germes respectifs.

Dans une série de recherches (7), (8), (9), (13), (14), ainsi que dans nos travaux antérieurs (10), (11), nous avons essayé d'obtenir des souches atténuées et immunogènes des différentes espèces du genre *Salmonella*, afin de trouver un vaccin contre la fièvre typhoïde pouvant conférer à l'homme une immunité forte et durable.

Nous avons préconisé, dans nos recherches, l'utilisation de vaccins préparés à partir des souches atténuées hétérologues, initialement peu virulentes pour l'homme et qui ont pu être expérimentées sur des animaux sensibles de laboratoire. En présence de l'infection avec la *S. typhi*, ces souches ont conféré une forte immunité et plus durable que celle conférée par le vaccin tué (méthode Kolle).

Dans ce travail, nous exposons les recherches faites en vue d'obtenir des souches d'us vétérinaire pour la vaccination des porcelets contre l'infection avec *S. cholerae suis*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons utilisé trois souches de *S. cholerae suis* (237, 959 et 960) provenant de la collection du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire.

Comme facteurs atténuants de la virulence on a eu recours à diverses substances (glycocolle, antibiotiques, bleu de méthylène, tripaflavine, lécithine) et à l'exposition à des températures plus élevées.

Le glycocolle, le bleu de méthylène, la tripaflavine et les antibiotiques employés (auréomycine, pénicilline, terramycine, polymyxine, chloromycétine, streptomycine), ont été préalablement dissous dans l'eau peptonnée en concentration progressive. La lécithine a été utilisée dans une concentration constante de 0,2% (maximum de solubilité). L'adaptation à des températures de plus en plus élevées a été faite dans une étuve à réglage.

L'adaptation des souches initiales aux conditions sus-mentionnées a été réalisée par passages quotidiens.

Les souches initiales, ainsi que les variantes obtenues après différents passages, ont été étudiées du point de vue: aspect des colonies, à la loupe binoculaire (illumination directe et oblique), morphologie et propriétés tinctoriales, structure antigénique et virulence.

La virulence des souches initiales et des variantes a été déterminée par des valeurs de DL_{50} avec suspensions de germes, inoculés par voie intrapéritonéale, à des souris blanches de 14—16 g. L'immunogénéité des souches initiales a été testée sur des souris blanches de 14—16 g, par deux inoculations souscutanées de 100 millions germes inactivés (58°C pendant une heure) à 7 jours d'intervalle et pour les variantes, par une seule inoculation souscutanée, en doses variables de germes vivants, selon leur degré d'atténuation. Les animaux ont été infectés dans les deux cas par voie intrapéritonéale, 14 jours après la dernière inoculation, avec 100—125 DCL de la souche virulente de S. cholerae suis 959. Les animaux ont été tenus sous observation pendant 20 jours. Le degré d'immunité conférée aux souris a été exprimé procentuellement. Un nombre variable de souris non-vaccinées ont servi comme témoins. Indifféremment du nombre des germes inoculés ils ont été suspendus dans 0,5 ml sérum physiologique.

Chez les variantes à virulence atténuée, qui ont néanmoins gardé en bonne partie leur immunogénéité, nous avons étudié: la capacité des germes inactivés de produire chez les animaux des agglutinines « O » et « H », la sensibilité aux antibiotiques et quelques propriétés fermentatives en comparaison avec les souches d'origine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les souches initiales de *S. cholerae suis* présentaient à la lumière oblique des colonies avec irisation rouge-verdâtre; elles agglutinaient spécifiquement avec les sérums VI, VII et c; la virulence (DL_{50}) des germes inoculés par voie intrapéritonéale variait entre 50.000—300.000 germes. Les souches de *S. cholerae suis* étant pratiquement virulentes à n'importe quelle dose pour la souris, on a déterminé la DL_{50} chez les souches initiales, en limitant la période d'observation à 12 jours. Pour les souches atténuées, le temps d'observation a été de 20 jours, mais il aurait pu être tout aussi bien illimité. Les souches inactivées n'immunisent pas, après deux inoculations sous-cutanées la souris, vis-à-vis de la souche S. cholerae suis 959 (mortalité 100%).

Pour chaque substance, on a déterminé la concentration maximum qui permet la croissance des souches initiales.

La souche 237, adaptée à 60 gamma/ml auréomycine, a présenté, après 32 passages, une appréciable diminution de la virulence, la DL_{50} oscillant autour de 40 millions germes. L'immunogénéité de la variante, inoculée en quantité de 10 millions germes a été de 61,5%. En portant la dose vaccinante à 20 millions germes, on observe une diminution de l'immunogénéité (38,6%) (Tableau I).

La même souche adaptée à 2000 U.I./ml pénicilline, s'est dissociée, après 30 passages, en colonies à irisation rouge et colonies à irisation grise. Les colonies à irisation grise étaient faiblement virulentes, la DL_{50} variant autour de 30 millions germes. L'immunogénéité de la variante à 10 millions germes a été de 69,2%. En portant la dose vaccinante à 20 millions germes, l'immunogénéité a atteint 78,8%. On n'a pu tester l'immunogénéité des colonies à irisation rouge à cause de leur degré élevé de virulence.

Tableau I

Le pouvoir immunogène de quelques variantes de S. cholerae suis avec virulence atténuée

Variantes de S. cholerae suis	Nombre de germes inoculés en millions	Souris infectées avec 125 DCL de la souche virulente S. cholerae suis 959							
		Animaux vaccinés avec la variante atténuée				Animaux témoins non vaccinés			
		total	vivants	morts	% vivants	total	vivants	morts	% vivants
237/32 *)									
auréomycine 60 gamma/ml	10	52	32	20	61,5	30	0	30	0
»	20	26	10	16	38,6	17	0	17	0
237/50									
colonies grises pénicilline									
2000 U.I/ml	10	13	9	4	69,2	14	0	14	0
»	20	33	26	7	78,8	15	0	15	0
237/18									
colonies grises terramycine									
80 gamma/ml	10	14	9	5	64,2	18	0	18	0
»	20	30	16	14	53,3	18	0	18	0
237/93									
bleu de méthylène 1/5000	5	15	10	5	66,6	20	0	20	0
»	10	49	34	15	68,9	30	0	3*n*	0
»	30	30	18	12	60,0	20	0	20	0
»	100	14	5	9	35,6	20	0	20	0
960/18									
pénicilline 100 U.I.ml	10	43	27	16	62,7	20	0	20	0
960/47									
streptomycine									
50.000 gamma/ml	20	31	19	12	61,3	20	0	20	0

*) La diagonale représente le nombre de passages de la souche respective.

Adaptée à 80 gamma/ml terramycine, la souche 237 a donné, après 18 passages, deux variantes: une avec colonies à irisation rouge et virulence peu modifiée, et une à colonies à irisation grise avec diminution importante de la virulence (DL_{50} à 50—60 millions germes). L'immunogénéité a varié en fonction du nombre des germes inoculés. Ainsi, 10 millions germes ont donné une immunité de 64,2% et 20 millions germes, une immunité de 53,3%.

La même souche, adaptée au bleu de méthylène dilué 1/5000, a donné après 93 passages, une variante à irisation rouge-verdâtre, dont la virulence a beaucoup baissé (DL_{50} environ 60 millions germes). L'immunogénéité de cette variante a été testée avec 5, 10, 30 et 100 millions germes, variant en fonction du nombre des germes inoculés. Cependant, l'immunogénéité pour les deux dernières doses a été inversement proportionnelle au nombre des germes inoculés. Ainsi, pour cinq millions germes, l'immunogénéité a été de 66,6%, pour 10 millions 68,9%, pour 30 millions 60% et pour 100 millions de 35,6% (Tableau I). Afin de confirmer la stabilité de cette souche, nous avons fait 10 passages sur souris et 100 sur gélose, sans observer des modifications de la virulence.

La souche 237, adaptée à la polymyxine et streptomycine, a donné des variantes avirulentes, qui ont perdu en grande mesure leur capacité immunogène. Adaptée à la chloromycétine et tripaflavine, elle a donné des variantes qui ont perdu leur spécificité antigénique, agglutinant avec du sérum

physiologique. Sur des milieux à fortes concentrations de glycocolle, de lécithine et par incubation à 46°C, la souche a gardé sa virulence intacte.

La souche 960, adaptée à 100 U.I./ml pénicilline, après 18 passages, a présenté une baisse de la virulence (DL_{50} environ à 30 millions germes). Pour 10 millions germes, l'immunogénéité de cette souche est de 62,7%. Par adaptation de la même souche à la streptomycine (50.000 gamma/ml), on a obtenu après 47 passages une variante à virulence atténuée (DL_{50} à 25—30 millions germes). L'immunogénéité de la souche est de 61,3% pour 20 millions germes (Tableau I).

Par adaptation à la terramycine, auréomycine, et incubation à 46°C la virulence n'a pas été modifiée.

À l'aide de la chloromycétine, lécithine, tripaflavine et bleu de méthylène, nous avons obtenu des variantes qui ont perdu la spécificité de type, agglutinant même avec du sérum physiologique, tandis qu'avec du glycocolle on a obtenu une variante avirulente, mais dépourvue d'immunogénéité.

La souche 959, par passages sur les substances mentionnées, a gardé, dans la majorité des cas, sa virulence non-modifiée. En ce qui concerne la pénicilline et la chloromycétine, on a observé une baisse plus accentuée de la virulence, mais l'immunogénéité des variantes était très réduite et ne correspondait plus au minimum utilisable pour des vaccins vivants.

Les variantes, à virulence réduite et forte immunogénéité, ont gardé leurs propriétés morphologiques et tinctoriales, par rapport à la souche initiale; l'agglutinabilité sur lame et en tubes vis-à-vis du sérum spécifique reste invariable.

Les variantes de *Salmonella cholerae suis*: 237/32 adaptées à l'auréomycine, 237/50 à la pénicilline, 237/93 au bleu de méthylène, 237/18 à la terramycine, 950/18 à la pénicilline et 960/47 à la streptomycine — qui pourraient être utilisées à la préparation de certains vaccins vivants — ont été étudiées du point de vue caractère antigénique, sensibilité aux antibiotiques et certaines propriétés fermentatives, par rapport aux souches initiales.

En ce qui concerne leur capacité de former chez le lapin des agglutinines « O » et « H » par immunisation avec des souches inactivées, une heure à 58°C, les variantes et les souches initiales n'ont pas présenté de différences marquées.

Observant quelques modifications de la sensibilité aux antibiotiques par rapport à la substance utilisée, nous avons étendu nos recherches, limitées d'abord aux variantes mentionnées, aussi à d'autres variantes, obtenues après un plus grand nombre de passages. Nous avons employé les antibiotiques suivants: pénicilline, streptomycine, sulfathiasole, nitrofuran*, polymyxine, auréomycine, érythromycine, néomycine, chloromycétine et hostacycline, incorporés dans l'amidon en proportion de 1/10. Les tests ont été faits sur boites de gélose ensemencées avec le germe à étudier, en déposant l'antibiotique à des distances adéquates, à l'aide d'une spatule; la lecture a été effectuée 18—20 heures après l'ensemencement, en tenant compte du diamètre du halo qui entourait l'antibiotique.

De nos observations, il résulte que la variante 237/18, initialement très peu sensible à la chloromycétine, adaptée à la terramycine, a présenté une sensibilité accrue, formant néanmoins, sur les boîtes Petri, des colonies secondaires à l'intérieur du halo. Le même phénomène a été remarqué pour la pénicilline, la variante initialement résistante finissant par devenir sensible à cet antibiotique.

La variante 237/93, adaptée au bleu de méthylène est aussi devenue plus sensible à la chloromycétine.

*) Antibiotique réalisé en Roumanie.

Les variantes: 960/32, adaptée à l'auréomycine et 960/93 au glycocolle, résistantes à la pénicilline, sont devenues très sensibles. La variante 959/48, adaptée à l'auréomycine, a présenté le même phénomène.

Les caractères fermentatifs ont été contrôlés pendant 35 jours dans de l'eau peptonnée, additionnée de 0,5%: maltose, lactose, manite, cellobiose, l-arabinose d-arabinose, saccharose, raffinose, tréhalose, inosite, dulcite, arbutine, l-xylose et glucose. On a testé un plus grand nombre de variantes que, celles pouvant servir à la préparation d'un vaccin vivant.

Les résultats ont été les suivants: aucune des souches initiales, de même que la majorité des variantes, n'ont fermenté le cellobiose, sauf les variantes 959/50 adaptées à la pénicilline et 237/19 à la polymyxine, qui ont fermenté après 30 jours, de manière mutative.

Le d-arabinose n'a pas été fermenté par les souches initiales 959 et 960, toutefois les variantes 959/50 et 960/65, adaptées à la terramycine, l'ont fermenté de manière mutative; la souche initiale 237 fermente le d-arabinose en 8 à 10 jours, alors que la variante 237/72 adaptée au glycocolle est incapable de le fermenter, même après 30 jours.

L'arbutine n'est pas fermenté par les souches initiales 237 et 960 mais il est faiblement fermenté par la souche initiale 959. On a observé que les variantes 959/50 adaptées à la pénicilline et 959/93 au bleu de méthylène, fermentent fortement l'arbutine en 30 jours et les variantes 237/19 adaptées à la polymyxine, 960/47 à la streptomycine, 960/18 à la pénicilline, 960/32 à l'auréomycine et 960/93 au glycocolle le fermentent plus faiblement dans le même intervalle de temps.

Il paraît qu'il existe une corrélation entre la fermentation du cellobiose et celle de l'arbutine. Les variantes 959/50 adaptées à la pénicilline et 237/19 à la polymyxine, qui fermentent le cellobiose, fermentent en même temps l'arbutine, sans que le phénomène inverse soit observé, même si l'ensemencement dans le cellobiose a été fait avec des souches provenant des tubes à essai dans lesquels l'arbutine a été fermenté.

Signalons enfin, que les variantes 237/73 et 960/93 adaptées au glycocolle, fermentent le glucose sans produire de CO_2.

En ce qui concerne les autres sucres, aucune différence n'a été observée entre les variantes et les souches initiales du point de vue durée et intensité de la fermentation, respectivement l'absence de fermentation.

DISCUSSION

Les résultats obtenus antérieurement, en utilisant différentes méthodes d'atténuation de la virulence des souches de *Salmonella* (10) (11) et *E. freundi* (12), nous montrent que l'efficacité de la méthode dépend surtout de l'espèce microbienne soumise à l'atténuation. Si pour *S. typhimurium*, *S. enteritidis Gärtner* et quelques souches d'*E. freundi*, le glycocolle constitue un moyen particulièrement efficace, par contre dans les cas de *S. cholerae suis*, il ne présente qu'une valeur plus réduite.

Pour la *S. cholerae suis*, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le bleu de méthylène, l'auréomycine et la pénicilline.

Contrairement aux autres types de *Salmonella*, atténués par nous jusqu'à présent, la majorité des variantes de *S. cholerae suis* donne le phénomène d'inhibition immunologique quand la dose vaccinante est fortement augmentée. Ainsi, la variante 237/93, adaptée au bleu de méthylène en dose de 10 millions germes

protège 68,9% des animaux, tandis que la dose de 100 millions germes ne protège que 36%. Cependant, sous une certaine dose de germes inoculés, la capacité immunogène du vaccin vivant baisse, comme dans le cas de la même variante chez laquelle 5 millions germes ne protègent que 66,6% des animaux. Les variantes: 237/32 adaptées à l'auréomycine et 237/18 à la térramycine présentent le même phénomène. Seule la variante 237/50, adaptée à la pénicilline, accroît le pourcentage de survivants à la suite de l'augmentation de la dose vaccinante. En réalité, pour chaque variante atténuée, il existe une dose de germes qui confère une immunité optime.

La possibilité d'employer de tels vaccins vivants, pour l'immunisation des porcelets contre les infections avec *S. cholerae suis*, présenterait un intérêt pratique particulier, à condition de tenir compte pour la solution définitive de ce problème, de la réactivité immunologique et de la sensibilité spécifique des jeunes animaux.

De même, l'étude de la stabilité des variantes par des passages en série sur porcelets, s'impose dans le cas où l'éventuelle utilisation de ces variantes serait adoptée.

CONCLUSIONS

1) Par l'adaptation de quelques souches de *S. cholerae suis* à différentes substances avec action antimicrobienne on a obtenu l'atténuation de la virulence d'un nombre de variantes, qui ont gardé intacte leur immunogénéité.

2) Les meilleurs résultats concernant le maintien de l'immunogénéité ont été obtenus pour les variantes adaptées au bleu de méthylène, auréomycine, pénicilline et terramycine.

3) On a observé chez la majorité des variantes atténuées et immunogènes, le phénomène d'inhibition immunologique quand la dose vaccinante a été fortement augmentée.

4) Certaines variantes ont présenté des modifications de sensibilité vis-à-vis de la pénicilline et chloromycétine et une série de modifications dans le métabolisme des glucides.

5) Etant donné les résultats obtenus, nous proposons l'utilisation des variantes atténuées et immunogènes pour la vaccination expérimentale des porcelets contre l'infection avec *S. cholerae suis*.

BIBLIOGRAPHIE

1. M. Herzberg et S. Elberg. — J. Bact., 1953, **66**, 585.
2. M. Herzberg, S. Elberg et K. E. Meyer. — J. Bact., 1953, **66**, 600.
3. Emelianova O. S. — Izmenicivost Mikroorganizmov 1956, 117. Medghiz, Moscou.
4. Hatenever L. M. et Tvetkova E. M. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol. 1949, No. 2, 72.
5. Maiski I. N. — Vest Akad. Med. Nauk SSSR, 1948, No. 5, 56.
6. Togunova A. I., Hrapkova N. V. et Fridenstein A. I. — Izmenicivost Mikroorganizmov 1956, 124.
7. Petrovskaia V. G. — Izmenicivost Mikroorganizmov 1956, 150 Medghiz, Moscou.
8. Petrovskaia V. G. — Izmenicivost Mikroorganizmov 1956, 164, Medghiz, Moscou.
9. Sviridova T. A. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1951, No. 3, 64.
10. Schafler S., Mintzer L. et Beneş S. - Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, no 1, 8.
11. Mintzer L. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 585.
12. Mintzer L. et Zilişteanu E. — Sous presse.
13. Timakov V. D. et coll. — Jurnal Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 3, 8.
14. Reitman M. et Iverson W. — Proc. Sympos. Antibiot., 1953, 604, Washington.
15. Yaniv H., Avi-Dor et Olitzki A. L. — L'Expérience 1953, **9**, 23.

ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ *S. CHOLERAE SUIS* ВЫРАЩИВАЕМЫХ В ПРИСУТСТВИИ ФАКТОРОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИБАКТЕРИЙНЫМИ СВОЙСТВАМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ.

1. Путём адаптации ряда штаммов S. cholerae suis к разным веществам, обладающим антибактерийными свойствами, удалось получить ряд вариантов с ослабленной вирулентностью но сохранивших иммуногенность.

2. Наилучшие результаты по сохранению иммуногенности дали варианты, адаптированные к метиленовой синьке, ауреомицину, пенициллину и террамицину.

3. При увеличении прививочной дозы, у большинства атенуированных и в то же время иммуногенных вариантов наблюдалось явление иммунологического торможения.

4. У некоторых вариантов наблюдались изменения чувствительностии по отношению к пенициллину и хлоромицетину и ряд изменений в обмене углеводов.

5. Имея в виду полученные результаты, мы предлагаем применение атенуированных иммуногенных вариантов для экспериментальной вакцинации поросят против инфекции, вызываемой S. cholerae suis.

UNTERSUCHUNG EINIGER IN DER GEGENWART VON EINE ANTIBAKTERIELLE WIRKUNG AUSÜBENDEN FAKTOREN GEZÜCHTETER STÄMME VON *S. CHOLERAE SUIS*

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Durch Anpassung einiger Stämme von *S. cholerae suis* an verschiedene Stoffe, die eine antibakterielle Wirkung ausüben, konnte die Virulenz bei einer Anzahl von Varianten, die ihre Immunogenität bewahrt hatten, abgeschwächt werden.

2. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Erhaltung der Immunogenität wurden bei den Varianten erzielt, die an Methylenblau, Aureomycin, Penicillin und Terramycin angepasst wurden.

3. Bei der Mehrzahl der abgeschwächten und immunogenen Varianten konnte, bei Steigerung der Impfdosis über eine bestimmte Grenze, die Erscheinung der immunologischen Hemmung beobachtet werden.

4. Einige Varianten wiesen eine veränderte Penicillin- und Chloromycetinempfindlichkeit, sowie eine Reihe von Änderungen des Zuckerstoffwechsels auf.

5. Angesichts dieser Ergebnisse, wird die Verwendung abgeschwächter und immunogener Varianten in der experimentellen Schutzimpfung von Ferkeln gegen die Infektion mit *S. cholerae suis* vorgeschlagen.

A STUDY OF SOME STRAINS OF *S. CHOLERAE SUIS* CULTURED IN THE PRESENCE OF FACTORS POSSESSING AN ANTIMICROBIAL ACTION

SUMMARY

1. By adapting strains of *S. cholerae suis* to various substances exerting an antimicrobial action, attenuation of virulence was obtained in a number of variants which had maintained their immunogenic potency.

2. The best results as regards maintenance of immunogenic potency were obtained in variants adapted to methylene blue, aureomycin, penicillin, and terramycin.

3. With most of the attenuated immunogenic variants a phenomenon of immunological inhibition was observed to occur when the immunizing dosis was increased beyond a certain limit.

4. Some of the variants displayed changes in their sensitivity to penicillin and chloromycetin as well as in their carbohydrate metabolism.

5. In view of these results we suggest the use of attenuated immunogenic variants in the experimental immunization of piglets against *S. cholerae suis* infections.

L'ACTION SPORONTOCIDE ET CLINO-PROPHYLACTIQUE DE LA PYRIMÉTHAMINE SIMPLE OU ASSOCIÉE À LA CHLOROQUINE

par

Eugenia Negulici, Piereta Constantinesco, Elena Teriteanu, P. Cortez, Aurelia Cristesco et Ionela Săndesco

(Travail effectué sous la direction de M. Ciucă — Hôpital « Gh. Marinesco » — Service d'Impaludation thérapeutique et Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Sections de Paludisme et d'Entomologie)

— Manuscrit reçu le 8 juillet 1959 —

La pyriméthamine (2:6 — Diamino—5—(6—chlorphényl) — 6 — éthylpyridine a été synthétisée aux États-Unis et les tests biologiques ont été établis en Angleterre par Covell et collab.

La pyriméthamine a été expérimentée depuis 1952 jusqu'à présent par différents investigateurs, démontrant l'importante *action de dévitalisation des gamétocytes par inhibition de la sporogonie* chez le moustique, ainsi que les effets clino-prophylactiques partiels.

Foy et Kondi (1952) étudiant *l'action sporontocide* de la dose unique de 20 mg de cette substance, ont appliqué à différents intervalles, après traitement, des lots d'anophèles sur des porteurs de gamétocytes à *P. falciparum*. Bien que les gamétocytes se trouvaient dans une proportion de 50%, les anophèles n'ont pas présenté d'oocystes ni des sporozoïtes.

Shute et Maryon (1954) ont essayé l'action sporontocide des différentes doses de pyriméthamine dans l'infection à *P. vivax* et *P. falciparum*. Ils ont constaté que les doses de 2,5 et 5 mg avaient une faible action sporontocide, alors que les doses de 25 et 50 mg *supprimaient complètement la sporogonie* chez les moustiques.

Jeffery et coll. (1956) administrant une dose unique de pyriméthamine dans une infection à *P. falciparum*, ont constaté qu'après le traitement les gamétocytes, bien que présents, étaient non-infectants pour les anophèles gorgés.

Raffaele et Carescia (1957) administrant une dose unique de 25 mg pyriméthamine, associée à 600 mg chloroquine ont obtenu les mêmes résultats dans l'infection à *P. vivax*. Les lots d'anophèles, appliqués avant le traitement, s'infectaient dans des proportions différentes, tandis que les lots appliqués après ne s'infectaient pas.

Young et Burgess (1957) administrant aux gamétocytophores 25 mg pyriméthamine et gorgeant des lots d'*A. quadrimaculatus* avant et après le traitement, ont constaté des effets sporontocides immédiats; les anophèles gorgés 12 heures après le traitement ont présenté des oocystes dégradés, qui n'ont plus donné de sporozoïtes. Seize heures après, on ne trouvait même plus d'oocysets.

Administrant en 1959 à des intervalles variant entre 8 à 61 jours des « doses uniques » progressives de 25 à 200 mg pyriméthamine aux patients infectés

par *P. vivax* (3 souches) et *P. falciparum* (1 souche), ces auteurs ont constaté: *l'efficacité de la dose unique*, vérifiée par l'absence de transmission de la sporogonie chez les anophèles gorgés après traitement; *rechutes* en moyenne, après 22 et 25 jours, chez la majorité des malades inoculés avec du sang virulent; *résistance des parasites* à une première dose de même qu'aux suivantes 4 ou 5 doses; *transmission de la résistance*, vérifiée par inoculations successives; *infectivité des anophèles après la deuxième et les doses suivantes, et la transmission de l'infection chez les indemnes.*

Dans la clino-prophylaxie, la dose unique de pyriméthamine est efficace dans l'infection à *P. falciparum* (Covell, 1955), tandis que dans l'infection à *P. vivax*, elle prolonge l'incubation (Schmidt, 1953).

Dans le programme des recherches, coordonnées sous les auspices de l'OMS, pour l'éradication de la malaria, on a effectué, en Roumanie, des recherches en rapport avec les souches locales de Plasmodium et une souche de Corée.

MÉTHODES DE TRAVAIL

Malades atteints de neuro-syphilis, soumis à l'impaludation thérapeutique:

1. par *P. vivax* (souches K; Mr.; V), inoculés seulement avec des sporozoïtes par piqûres de moustiques ou suspension de sporozoïtes;
2. par *P. falciparum* (souche « R-Fil ») inoculés avec du sang virulent ou sporozoïtes.

L'impaludation a été suivie d'examens quotidiens de sang en goutte épaisse, complétés par des frottis après l'apparition de la parasitémie. Aux porteurs de gamétocytes, on a administré, après un nombre variable de paroxismes, la dose unique du médicament à contrôler.

Des lots d'*A. atroparvus* de l'élevage de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » (clones « Stefănești ou Pîrlita ») s'appliquaient avant et à différents intervalles après le traitement, jusqu'à la disparition de la parasitémie. Les anophèles gorgés étaient séparés et gardés dans l'insectarium du Service, à 25—27°C, humidité 60—90%. La dissection des moustiques se faisait à partir du 5-e jour et continuait jusqu'à l'épuisement du lot.

Afin d'établir la date de l'apparition des rechutes, après la disparition de la forme primaire, les malades étaient soumis à un contrôle hebdomadaire jusqu'à leur départ de l'hôpital.

La durée de l'observation a été de 20 à 370 jours.

Les essais de clino-prophylaxie consistaient dans l'administration d'une dose unique de pyriméthamine, suivie à des intervalles variables de l'impaludation des malades par piqûres d'anophèles infectés ou bien par l'inoculation de suspension de sporozoïtes.

RÉSULTATS

I. Impaludations thérapeutiques par *P. vivax* « K, Mr, V ».

La souche *P. vivax* « K » provenait d'une rechute (paludisme coréen), au 36-e passage, par inoculation de sang virulent et les souches locales « Mr et V » d'une infection primaire du terrain, 15-e et 17-e passage. La souche « K » importée, ne différait pas des souches locales de *P. vivax* du point de vue pathogénité, réaction immunologique, gamétogénèse et taux d'infectivité pour l'*A. troparvus*.

Sur 19 malades impaludés par sporozoïtes, on a étudié:

a) l'action sporontocide chez 11 malades;

b) les effets clino-prophylactiques chez 8 malades.

a) *Effets sporontocides et schizontocides de la dose unique de pyriméthamine seule ou associée à la chloroquine.* Sur 11 malades, 9 ont été impaludés avec la souche « K », 1 avec la souche « Mr » et 1 avec la souche « V ».

A divers intervalles, après l'apparition des gamétocytes (7 et 16 jours), on a administré dans deux cas — B. V. et D. I_2 — la dose unique de 25 et 50 mg pyriméthamine; aux neuf autres — B. I_3, C. B_4, V. S_5, O.R.$_6$ V. E_6, R.A.$_{84}$ D. F_{85}, V. N.$_{94}$, D. B.$_{99}$ — la dose unique associée de 25 mg pyriméthamine avec 600 ou 300 mg chloroquine de base.

L'effet sporontocide — avec dévitalisation immédiate des gamétocytes — était vérifié par la non-infectivité des lots d'anophèles appliqués après le traitement.

L'effet schizontocide a été vérifié par: la disparition de la fièvre dans les premières 24 heures, et de celle de la parasitémie après 8 jours pour les cas traités à la pyriméthamine seule et après 4 jours, lorsque la pyriméthamine était associée à la chloroquine.

Les recherches effectuées, ont montré que les anophèles nourris sur les malades « avant l'administration du médicament », s'infectaient dans une proportion de 20—100%, tandis que les lots nourris sur les malades 4 et 24 heures « après le traitement » ne s'infectaient plus. Absence d'oocystes à la dissection.

Dans 5 cas, les lots d'anophèles, appliqués 23 et 7 jours après le traitement, n'ont pas été infectés, attendu que la densité gamétogène était très faible. Les résultats détaillés de cette expérience sont exposés dans le tableau I.

Au cours des observations, trois malades (V. S_5, O. R_6 et V. $E_{6,}$) sur 11 hospitalisés pour une plus longue durée *ont présenté des rechutes* 220, 211 et 272 jours après la 1-e dose, et respectivement 91, 43 et 85 jours après la 2-e dose unique.

La description des cas est donnée ci-dessous:

V.S_5.

P. vivax « K »

A. *Impaludation répétée par sporozoïtes*
3 III, 6 III, 14 III, 18 III, 28 III
3 IV, 1958 .....A_0P+
6 IV, 1958 .....A+P+
11 *IV*, 1958 *une dose unique*
(Pyriméthamine 25 mg + chloroquine 300 mg
14 IV, 1958 au 25 VIII 1958 (102 jours) A_0P_0

B. Impaludation par sporozoïtes à *P. falciparum* 25 VII, 1958
3 VIII 1958 .....A+P+
18 VIII 1958, 2-*e dose unique* (Pyriméthamine 25 mg + chloroquine 300 mg)
19 VIII 1958—15 IX, 1958 A_0P+
6 IX 1958—16 XI, 1958 (62 jours) A_0P_0

17 XI, 1958 I-e rechute par P. *vivax*
17 XI, 1958—16 XII, 1958 .....AoP+
16 XII, 1958 — traitement schizontogamétocide
(Chloroquine 450 mg + Plasmoquine 0,02 × 1
(Chloroquine 150 mg + Plasmoquine 0,02 × 2

17 XII, 1958—27 III, 1959 (100 jours)A_0P_0
Rechute à *P. vivax* 220 jours après la 1-e dose unique
91 jours après la 2-e dose unique
Durée de la période d'observation 350 jours.

Expériences avec *P. vivax*

a) **Effet sporontocide et schizontocide de la dose unique de pyriméthamine seule inoculation de**

Cas	Traitement			Repas de sang	
	No. jours de l'apparition de l'infection	Pyriméthamine	Chloroquine	Avant (—) Après (+) appliq. traitement	No. d'Anophèles disséq.
B.V./$_1$	11	50 mg	—	— 4 j. + 24 h. + 7 j.	22 6 6
D.I./$_2$	12	25 mg	—	— 2 h. + 3 j. + 7 j.	10 8 4
B.I./$_3$	10	25 mg	600 mg	— 24 h. + 24 h. + 3 j.	48 6 10
C.G./$_4$	16	25 mg	600 mg	— 24 h. + 4 h. + 8 h.	28 20 10
V.S./$_5$	9	25 mg	300 mg	— 24 h. + 4 h. + 24 h.	27 37 28
O.R./$_6$	12	25 mg	300 mg	— 24 h. + 4 h. + 24 h.	42 42 50
V.E./$_6$'	16	25 mg	300 mg	— 24 h. + 4 h. + 24 h.	38 30 26
R.A./$_{84}$	13	25 mg	300 mg	— 1 h. + 24 h. + 3 j.	34 25 16
D.F./$_{85}$	7	25 mg	300 mg	— 1 h. + 24 h.	20 30
V.N./$_{94}$	9	25 mg	300 mg	— 1 h. + 24 h.	40 40
D.G./$_{99}$	10	25 mg	300 mg	— 2 h. + 24 h. + 2 j.	37 21 27

Tableau I

(sources « K, Mr et V »)
ou associée à la chloroquine dans l'infection par *P. vivax* provoquée par sporozoïtes

A. mac. atroparvus		Disparition				
Anoph. infest.	Gamétocytes/ml.	Trophozoïtes	Gamétocytes	Rechutes	Rechutes	No. jours d'observation après traitement
		jours de traitement				
31.8 0 0	400 « rares » 0	3	7			120
40 0 0	400 « rares » « très rares »	3	8			96
25 0 0	400 100 « très rares »	2	4			106
20 0 0	400 « rares » 273	1	2			138+ 104 (pause 3 mois)
100 0 0	300 284 349	2	3	220 j. après 1-e dose 91 j. après 2-e dose	—	350
100 0 0	420 114 194	2	4	211 j. après 1-e dose 43 j. après 2-e dose	46 j. après 3-e dose	370
100 0 0	121 95 96	1	3	272 j. après 1-e dose 85 j. après 2-e dose	—	333
29 0 0	925 748 54	2	4	—	—	147
85 0	464 218	2	4			22
34,3 0	445 80	2	4			25
100 0 0	380 196 50	3	4			91

O.R_6

P. vivax « K »

A. *Impaludation par sporozoïtes*
21 IV, 1958

3 V, 1958 ..... A_0P+
5 V, 1958 ..... $A+P+$
15 V, 1958 1e dose unique de Pyriméthamine 25 mg + Chloroquine 300 mg
16 V, 1958—18 V, 1958 ..... A_0P+
19 V, 1958—9 X, 1958 ..... A_0P_0

B. *Impaludation avec sang de P. falciparum* « R-Fil »

15. X. 1958 ..... A_0P+
17. X. 1958 ..... $A+P+$
30. X. 1958 2-e dose unique de Pyriméthamine 50 mg
1. XI, 1958—1. XII, 1958 .... A_0P+
1. XII, 1958—11. XII, 1958.... A_0P+

I. *Rechute à P. vivax*
12. XII. 1958

12. XII, 1958—18. XII, 1958.... A_0P+
19. XII, 1958—30. XII, 1958.... $A+P+$
31, XII, 1958 ..... 3-e dose unique Pyriméthamine 25 mg+chloroquine 300 mg
2. I. 1959—15. II. 1959 ..... A_0P_0

II. *Rechute par P. vivax*

16. II, 1959..... A_0P+
18. II, 1959..... $A+P+$
20. II, 1959—8.VII.1959 ..... A_0P+

I. Rechute { 211 jours après la 1-e dose unique
II. Rechute { 43 jours après la 2-e dose unique
46 jours après la 3-e dose unique

Des lots d'anophèles ont pu être infectés à la 1-e et 2-e rechute
Durée de la période d'observation: 370 jours.

V.E_6,

P. vivax « *K* »

Impaludation par sporozoïtes
21. IV, 1958

5. V. 1958 ..... A_0P+
8. V, 1958 ..... $A+P+$
20. V, 1958, 1e *dose unique* Pyriméthamine 25 mg+chloroquine 300 mg
25. V, 1958—24. XI, 1958 ..... A_0P_0

24. XII, 1958 2e *dose unique de 50 mg pyriméthamine. Impaludation par sporozoïtes de P. falciparum* « *R-Fil* »
1. XII, 1958 1,8 ml suspension i/v.
2. XII, 1958 1 A. atrop.
5. XII, 1958 1 A. atrop+0,6 ml suspension i/v.
24. XII, 1958—15. II, 1959 A_0P_0

Rechute à *P. vivax*

16. II, 1959..... A_0P+
16. II, 1959—24. II, 1959 ..... A_0P+
25. II, 1959—9. III, 1959 ..... A_0P_0

Rechutes { 272 jours après la 1-e dose unique
85 jours après la 2-e dose unique

Durée de la période d'observation: 333 jours.

En résumé, les résultats des recherches effectuées sur 11 gamétocytophores concernant l'efficacité de la dose unique, confirment l'activité inhibitrice de la sporogonie par la non-infectivité des lots d'anophèles, nourris à partir des premières 4 heures jusqu'à l'épuisement de la parasitémie. L'effet schizontocide était relativement lent lorsque la pyriméthamine était administrée seule et, par contre, visiblement accélérée lorsqu'elle était associée à la chloroquine.

L'apparition des rechutes « tardives » chez trois des malades — après 220, 211 et 272 jours, à la suite de la première dose unique associée et 91, 43 et 85 jours après la 2-e dose unique, met nettement en évidence l'inactivité de la pyriméthamine sur le *cycle exo-érythrocytaire tissulaire retardé du parasite.*

La seconde rechute « tardive » chez le malade O. R_6, 46 jours après la 3-e dose unique, confirme entièrement cette hypothèse.

b) *Durée de l'effet clino-prophylactique de la dose unique de pyriméthamine.* On a administré une dose unique de 25 et 50 mg pyriméthamine, à 6 malades — D. V_7, I. D_8, J. N_9, L. N_{98}, S. M_{90}, A. C_{91} — infectés ensuite avec des sporozoïtes *de P. vivax* (souche « K »), le même jour ou à différents intervalles, pendant plusieurs semaines (tableau II).

Les premiers trois malades — D. V_7, I. D_8, J. N_9 — ont été impaludés à plusieurs reprises, à des intervalles de 7 et 14 jours (par piqûres d'anophèles ou inoculations de suspensions de sporozoïtes) jusqu'à l'apparition des parasites dans le sang circulant.

Le malade L. N_{98} a reçu, 5 jours après traitement par pyriméthamine, des inoculations de sporozoïtes, pendant 3 jours de suite. Quatre-vingt-neuf jours plus tard, il quitte l'hôpital et reçoit un traitement d'entretien — chloroquine +plasmoquine, pendant 3 jours. Il revient après 4 mois, accusant des douleurs tabétiques. Deux cent cinquante-cinq jours après l'impaludation, il est fébrile et présente des parasites dans le sang.

Le malade S. $M._{90}$, impaludé avec des sporozoïtes, 24 heures, 23 et 25 jours après l'administration de la dose unique de pyriméthamine, quitte l'hôpital 60 jours plus tard, après avoir reçu un traitement de sûreté avec chloroquine + plasmoquine, pendant 3 jours. Il revient à l'hôpital et présente des parasites dans le sang, 282 jours après la première impaludation.

Le malade A. G_{91} a été impaludé avec des sporozoïtes 6, 30 et 60 jours à partir de la dose unique de pyriméthamine. Il reçoit deux séries de traitement de sûreté schizonto-gamétocide, le 40-e et 90-e jour après l'impaludation. Sous observation, pendant cette période, l'infection clinique et parasitaire fait son apparition après 255 jours de la première impaludation.

Deux malades, ayant reçu après la dose unique de 25 mg pyriméthamine, une inoculation avec du sang virulent (groupe compatible), sont restés négatifs pendant les 30 jours d'observation.

En résumé: le résultat des essais clino-prophylactiques avec la dose unique de 25 et 50 mg pyriméthamine, administrée à 6 malades, a montré :

— l'apparition de la maladie clinique et parasitaire après une période plus courte (63,50 et 43 jours) chez les trois premiers malades impaludés, à de brefs intervalles, par inoculations répétées de sporozoïtes.

Tableau II

Expérience avec *P. vivax* (souche « K »)
***b)* Durée de l'effet clino-prophylactique d'une dose unique de pyriméthamine**

Cas	Traitement clino-prophylactique		Date de l'inoculation de sporozoïtes								Traitement schizonto-gamétocyte en incubation	Date de l'apparition des parasites	Période de protection clino-prophylactique
	Pyri-métha-mine	Date	1-e	2-e	3-e	4-e	5-e	6-e	7-e	8-e			
D.V./$_{7}$	25 mg	21.I	21.I	4.II	18.II	25.II	4.III	13.III	18.III	25.III	—	14.IV	AoPo 63 j. de protection A+P+ 21 j. d'incubation
J.D./$_{8}$	50 mg	24.I	25.I	8.II	22.II	8.III	15.III	21.III	29.III	—	—	31.III	AoPo 50 j. de protection A+P+ 16 j. d'incubation
J.N./$_{9}$	50 mg	5.II	13.II	20.II	6.III	13.III	20.III	27.III	—	—	—	31.III	AoPo 43 j. de protection A+P+ 11 j. d'incubation
L.N./$_{98}$	50 mg	18.IV	23.IV	24.IV	25.IV	—	—	—	—	—	21.VII.1958	5.I	AoPo 89 j. de protection A+P+ 255 j. d'incubation
S.M./$_{90}$	50 mg	31.VII	1.VIII	23.VIII	25.VIII	—	—	—	—	—	29.IX.1958	10.V	AoPo 50 j. de protection A+P+ 282 j. d'incubation
A.G./$_{91}$	50 mg	31.VII	6.VIII	6.IX	6.XI	—	—	—	—	—	15.IX.1958 8.XII.1958	18.IV	AoPo 40 j. de protection 255 j. d'incubation

— l'apparition de la maladie clinique et parasitaire après une période plus longue, soit 255, 282 et 255 jours, à partir de la première impaludation des trois derniers malades, qui pendant l'incubation ont reçu un traitement schizonto gamétocide.

Ces constatations démontrent que:

1. la pyriméthamine n'a pas d'action sur les sporozoïtes de *P. vivax*, ni sur les formes pré-érythrocytaires;

2. l'action clino-prophylactique sur les formes *érythrocytaires* de *P. vivax* présente une durée variable (AoPo) de 63, 50, 43, 89, 50 et 40 jours respectivement.

3. Connaissant l'action anti-sporogonique et suppressive de la pyriméthamine, nous proposons comme limite de sûreté dans la clino-prophylaxie du paludisme, son administration, pendant la saison épidémique, en association avec la chloroquine, à 3—4 semaines d'intervalle.

II. *Expérience avec le P. falciparum* (souche « R-Fil ».)

Cette souche a été isolée d'une infection, survenue dans un micro-foyer résiduel de paludisme.

Au début de l'expérience, cette souche avait subi 13 passages par sang virulent.

a) *Effet sporontocide et schizontocide d'une dose unique de pyriméthamine, seule ou associée à la chloroquine.* Quinze malades ont été impaludés thérapeutiquement avec la souche « R-Fil »: 10 par inoculation de sang virulent — $L.I_{13}$, $C.T_{62}$, $D.S_{67}$, $I.N_{80}$, $Z.N_{83}$, $C.P_{86}$, $A.G_{87}$, $M.P_{89}$, $O.R_{92}$, $C.I_{93}$ — et 5 par inoculation de sporozoïtes — $C.E_{63}$, $D.T_{70}$, $B.A_{81}$, $B.C_{82}$, $V.S_{88}$.

On a administré à ces malades, la dose unique le 5-e et le 24-e jour, à partir de l'apparition des gamétocytes. Cinq malades — 13, 65, 70, 86, 92 — ont reçu une dose unique de 25 ou 50 mg pyriméthamine; 10 malades — 62, 67, 80, 81, 82, 83, 87, 88, 89, 93 — une dose unique de 25 mg pyriméthamine, associée à 600 ou 300 mg chloroquine, base.

Les lots d'anophèles *(A. atroparvus)*, nourris sur les malades, 1 à 24 heures avant l'administration de la pyriméthamine, se sont infectés, dans une proportion de 11—72%. Dans 2 cas — 13 et 92 — la proportion d'anophèles infectés a été de 100%.

Aucun des anophèles, gorgés 2 à 24 heures après le traitement, *n'a été infecté.* D'autres lots d'*A. atroparvus* ont été nourris à divers intervalles, à partir de l'administration du médicament (8 cas, après une semaine; 4 après 2 semaines; 3 après 3 semaines) — aucun anophèle ne s'est infecté. Les détails sont donnés dans le tableau III.

b) *Durée de l'effet clino-prophylactique de la dose unique de pyriméthamine dans l'infection à P. falciparum.* On a essayé l'action clino-prophylactique de la dose unique de 50 mg pyriméthamine sur 3 malades — $R.M_{95}$, $C.D_{96}$, $V.E_{97}$.

Deux malades ont reçu une inoculation de sporozoïtes, 24 heures et 7 jours après l'administration de la dose unique de pyriméthamine, le troisième étant également inoculé avec des sporozoïtes, 7 jours après, pendant 3 jours de suite. Un de ces malades, négatif, a quitté l'hôpital après 92 jours, les deux autres se trouvent sous observation depuis 284 et 141 jours, durant lesquels ils n'ont pas fait la maladie.

Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Tableau III

Expérience avec *P. falciparum* (source « R-Fil »)

***a)* Effet sporontocide et schizontocide d'une dose unique de pyriméthamine — simple ou associée à la chloroquine — dans le paludisme par P. falciparum (inoculation de sang ou de sporozoïtes)**

Cas.	TRAITEMENT		Repas de sang A. mac. atroparvus						Disparition		Période d'observation après traitement (jours)
	Nombre jours de l'apparition de l'infection		Pyriméthamine	Chloroquine	Avant (—) Après (+) application du traitement	No. d'Anophèles disséq.	Moustiques infectés %	Gamétocytes/ml.	Trophozoïtes	Gamétocytes	
	Trophozoïtes	Gamétocytes									
L.I./$_{13}$	34	24	50 mg	—	— 16 j.	16	100	3400	3	—	30
					— 24 h.	45	17.2	108			
					+ 24 h.	30	0	146			
					+ 4 j.	14	0	175			
					+ 14 j.	20	0	441			
C.E./$_{65}$	23	14	25 mg	—	— 24 h.	42	17,6	« rares »	3	34	197
					+ 24 h.	36	0	« rares »			
					+ 7 j.	26	0	« très rares »			
D.T./$_{70}$	19	9	25 mg	—	— 24 h.	32	72.2	60	2	38	329
					+ 24 h.	18	0	« rares »			
					+ 7 j.	28	0	« rares »			
					+ 14 j.	28	0	« très rares »			
C.T./$_{62}$	14	7	25 mg	300 mg	— 24 h.	52	24.2	175	2	32	201
					+ 24 h.	38	0	326			
					+ 11 j.	16	0	82			
D.S./$_{67}$	15	7	25 mg	600 mg	— 24 h.	22	18.5	163	3	—	88
					+ 24 h.	26	0	233			
					+ 7 j.	22	0	« rares »			
I.N./$_{80}$	14	7	25 mg	300 mg	— 24 h.	46	68.7	676	2	25	55
					+ 4 h.	47	0	582			
					+ 24 h.	36	0	463			
					+ 6 j.	44	0	159			
					+ 13 j.	30	0	242			
					+ 21 j.	24	0	« très rares »			

B.A./81	15	5	25 mg	300 mg	— 24 h.	47	18.4	136	2	32	72
					+ 24 h.	32	0	383			
					+ 7 j.	38	0	160			
B.C./82	22	11	25 mg	300 mg	— 24 h.	55	11.5	50	2	28	40
					+ 24 h.	28	0	39			
					+ 7 j.	30	0	13			
Z.N./83	20	11	25 mg	300 mg	— 1 h.	37	59	210	2	28	298
					+ 24 h.	20	0	158			
					+ 7 j.	32	0	104			
					+ 14 j.	18	0	« très rares »			
					+ 21 j.	13	0	« très rares »			
C.P./86	30	21	50 mg	—	— 1 h.	38	34.4	189	4	13	29
					+ 24 h.	25	0	177			
					+ 10 j.	30	0	272			
A.G./87	17	10	25 mg	300 mg	— 1 h.	28	23.8	116	2	35	267
					+ 24 h.	25	0	68			
					+ 8 j.	20	0	72			
V.S./88	16	8	25 mg	300 mg	— 1 h.	26	59	1460	4	29	227
					+ 3 h.	26	0	934			
					+ 24 h.	26	0	789			
					+ 7 j.	16	0	61			
M.P./89	13	5	25 mg	300 mg	— 1 h.	40	31	939	3	32	85
					+ 24 h.	46	0	1278			
					+ 8 j.	20	0	192			
O.R./92	16	9	50 mg	—	— 24 h.	44	100	805	3	31	176
					+ 2 h.	20	0	454			
					+ 24 h.	56	0	362			
					+ 7 j.	66	0	225			
					+ 14 j.	27	0	96			
					+ 21 j.	27	0	« très rares »			
C.I./93	20	9	25 mg	300 mg	— 1 h.	50	70.9	2463	2	32	163
					+ 24 h.	40	0	1929			
					+ 10 j.	12	0	506			
					+ 15 j.	28	0	136			

Tableau IV

Expériences avec P. falciparum (souche « R-Fil »)
***b)* Durée de l'effet clino-prophylactique de la dose unique de pyriméthamine**

Nombre cas	Traitement		Date de l'administration des sporozoïtes				Date de l'apparition des parasites	Période d'observation (en jours)
	Pyriméthamine	Date	1-a	2-a	3-a	4-a		
R.M.$_{95}$	50 mg	13.XI	20.XI	—	—	—	0	284
C.G.$_{96}$	50 mg	13.XI	14.XI	—	—	—	0	92 (2.II.1959, trait. schiz. gamétocide)
V.E.$_{97}$	50 mg	24.XI	1.XII	2.XII	5.XII	—	0	141

CONCLUSIONS

Des études sur *l'action sporontocide* de la dose unique de pyriméthamine, simple ou associée à la chloroquine, ont abouti à une série de résultats avec application pratique précise dans le programme de l'éradication du paludisme, confirmés d'ailleurs par d'autres paludologues.

Impaludation thérapeutique avec des sporozoïtes à P. vivax. La pyriméthamine, seule ou associée à la chloroquine, a été administrée en dose unique à 11 porteurs de gamétocytes, dont le sang était infectant pour A. atroparvus, 1 à 24 heures avant le traitement. Les lots d'anophèles, gorgés après traitement, ont démontré l'action inhibitrice sur le cycle sporogonique, dans 100% des cas expérimentés.

Dans ces expériences, la dévitalisation des gamétocytes a été active jusqu'au 7-e jour, après l'administration du médicament, vérifié par la non-infectivité des anophèles gorgés, intervalle coïncidant avec une importante diminution du nombre des gamétocytes.

L'effet schizontocide lent, mais constant, de la dose unique de pyriméthamine sur les *formes érythrocytaires* du parasite, est fortement activé et accéléré par l'association de la chloroquine.

Une dose unique de 25 et 50 mg pyriméthamine, administrée avant l'impaludation de 6 patients inoculés avec des sporozoïtes et 2 avec du sang virulent, n'a pas exercé une action parasiticide:

1. contre le sporozoïte pendant son bref circuit — après piqûre de l'anophèle infecté ou inoculation répétée de suspension par voie veineuse et

2. contre les formes pré-érythrocytaires.

L'infection clino-parasitaire est apparue après une période de protection clino-prophylactique de: 63, 50 et 43 jours chez les trois premiers malades et de 255, 282 et 255 jours chez les trois autres, qui ont reçu le traitement schizonto-gamétocide, après 89, 50 et 40 jours.

Les formes exo-érythrocytaires tissulaires « tardives » de *vivax* sont *incontestablement résistantes;* l'apparition des rechutes tardives, chez trois gamétocytophores, après 220, 211 et 272 jours, respectivement après la l-e dose unique et

91, 43, 85 jours, respectivement après la seconde dose unique, en est la *preuve évidente.*

Impaludation thérapeutique à P. falciparum. L'action inhibitrice de la sporogonie après la dose unique de pyriméthamine seule ou associée à la chloroquine, chez 15 gamétocytophores, est confirmée dans la totalité des cas par la non-infectivité des lots d'*A. atroparvus*, gorgés après le traitement.

L'absence de rechutes chez les 15 malades impaludés par *P. falciparum*, contrôlés 30 à 329 jours, va de paire avec la rareté des rechutes « à long terme » dans l'infection naturelle à *P. falciparum.*

Le phénomène contraste nettement avec les particularités de la résistance des *formes exo-érythrocytaires de P. vivax.*

La dose unique de 50 mg pyriméthamine, a été administrée clino-prophylactiquement à trois malades avant impaludation aux sporozoïtes. Aucun n'a présenté d'infection pendant les 92, 284 et 141 jours d'observation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Burgess. et M. Young. — Bull OMS, 1959, **20**, 37.
2. Covell G. — Brit. Med. J. 1953, 41.
3. Falco et coll. — Brit. J. Pharmacol. a. Chemotherapy, 1951, **4**, 185.
4. Foy et Kondi. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg., 1952. **46**, 370.
5. Jeffery G. et coll. — Am. J. Hyg., 1956. **64**, 41.
6. Miller M. J. et coll. — Doc. Travaux. Lisbonne, 1958, No. 36.
7. Raffaele G. et Carescia P. M. — Riv. Malariologia, 1957, **36**, 227.
8. Schmidt L. H. — J. Pharmacol. et Exp. Thérap., 1953. **50**, 450.
9. Shute P. G. et Maryon M. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg., 1954. **48**, 50.
10. Young M. et Burgess R. — Am. J. Trop. Med. a. Hyg., 1957. **6**, 805.
11. Young M. et Burgess R. — Bull. OMS., 1959. **28**, 27

СПОРОНТОЦИДНОЕ И КЛИНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПИРИМЕТАМИНА, ОТДЕЛЬНО ИЛИ В АССОЦИАЦИИ С ХЛОРОХИНОМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Изучали « споронтоцидное, селективное действие » однократной дозы пириметамина, одного или в ассоциации с хлорохином и « клино-профилактику » при помощи однократной дозы пириметамина при терапевтической импалюдации с спорозоитами *P. vivax*. Однократная доза вводилась 11 носителям гаметоцитов, кровь которых оказалась инфицирующей для A. *atroparvus* за сутки перед лечением. Изучение анофелесов кормящихся спустя от часа до суток после лечения показало задерживающее действие на спорогонный цикл в 100% случаев (от 4 до 7 дней).

У больных, пробывавших в больнице в течении более длительного срока наблюдались поздние рецидивы после двух однократных доз, введенных повторно.

Введение перед импалюдацией, однократной дозы приметамина в 25 или 50 мг больным, которым вводили спорозиты, не оказало паразитицидное действие:, у данных больных клино-паразитарная инфекция появилась после предохранения в 43—63 дней. При терапевтической импалюдации с P. *falciparum* (при помощи вирулентной крови или спорозоитов) задерживающее действие однократной дозы, введенной 15 больным подтверждено в 100% случаев путем отсутствия заражаемости у серии атропарвусов, перекормленных в течении 2 часов спустя 21 день).

Отсутствие рецидивов у данных больных, контролированных в течении 329 дней, подтверждает другие наблюдения. Единственная доза в 50 мг пириметамина, введенная 3 больным до импалюдации при помощи спорозоитов, воспрепятствовала появлению инфекции в течении 92, 141 и 284 дней наблюдения; это и является доказательством вышесказанного.

DIE SPORONTOZIDE UND KLINOPROPHYLAKTISCHE WIRKUNG DES PYRIMETAMINS, ALLEIN ODER IN VERBINDUNG MIT CHLOROCHIN

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen betreffen die „sporontozide Selektionswirkung" einer Einzeldosis von Pyrimetamin, allein oder in Verbindung mit Chlorochin, sowie die „Klinoprophylaxe" der Einzeldosis von Pyrimetamin ohne anderen Zusatz, in der therapeutischen Malariainfizierung mit Sporozoiten von *P. vivax*. Die Einzeldosis wurde 11 Trägern von Gametocyten verabreicht, deren Blut, 1—24 Stunden vor der Behandlung, für *A. atroparvus* infizierend war. Anophelesgruppen, die 4 Stunden—7 Tagen nach der Behandlung zur Ernährung zugelassen wurden, erwiesen die hemmende Wirkung auf den sporogonischen Entwicklungszyklus in 100% der Fälle (von 4 bis 7 Tagen).

Drei der Patienten, die längere Zeit im Spital verblieben, wiesen späte Rezidiven nach zwei wiederholten Einzeldosen auf.

Eine Einzeldosis von 25 oder 50 mg Pyrimetamin, mit Sporozoiten infizierten Patienten, vor der Malarisierung verabreicht wurde, übte keine parasitizide Wirkung aus, da die klinoparasitäre Infektion nach einer Schutzperiode von 43 bis 63 Tagen auftrat. Bei der therapeutischen Malarisierung mit *P. falciparum* (virulentes Blut oder Sporozoiten) konnte die Hemmungswirkung einer 15 Patienten verabreichten Einzeldosis, in 100% der Fälle bestätigt werden. Gruppen von *A. atroparvus*, die bis 21 Tagen, zwei Stunden genährt wurden, erwiesen sich als nicht infektiös.

Die Abwesenheit von Rückfällen bei diesen Kranken, die 329 Tage unter Kontrolle gehalten wurden, bestätigt andere Beobachtungen. Beweisend ist die Tatsache, dass eine, 3 Patienten vor der Malarisierung mit Sporozoiten verabreichte, Einzeldosis von 50 mg Pyrimetamin, das Auftreten der Infektion 92, 141 und 284 Tage verhinderte.

THE SPORONTOCIDAL AND CLINOPROPHYLACTIC ACTION OF PYRIMETAMINE, ALONE OR IN ASSOCIATION WITH CHLOROQUINE

SUMMARY

Investigations were carried out concerning the "selective sporontocidal action" of a single dosis of pyrimetamine, alone or in association with chloroquine, as well as "clinoprophylaxis" by means of a single dosis of pyrimetamine, in therapeutic malarial infection with sporozoites of *P. vivax*. The single dosis was administered to 11 gametocyte carriers whose blood was infective for *A. atroparvus* 4 hours—7 days before the treatment. The groups of anopheles fed from 4 hours—7 days following the treatment demonstrated the inhibiting action exerted on the sporogonic cycle in 100% of the cases (from 4 to 7 days).

Three of the patients, hospitalized for a longer period, exhibited delayed relapses after two repeated single doses.

A single dosis of 25 or 50 mg pyrimetamine administered before malarial infestation to patients inoculated with sporozoites did not display any parasiticidal action, the clinoparasitic disease setting in after a period of protection ranging from 43 to 63 days.

In malariotherapy with *P. falciparum* (virulent blood or sporozoites), the inhibiting action of a single dosis administered to 15 patients was confirmed in 100% of cases by the absence of infectiousness of groups of *A. atroparvus* fed for two hours after 21 days.

The absence of relapses in these patients, who were followed up for 329 days, confirm other observations. The evidence consists in the fact that a single dosis of 50 mg pyrimetamine administered to three patients before infection with sporozoites prevented the appearance of the infection for 92,141, and 284 days of observation respectively.

COLONIES ATYPIQUES DE *STAPHYLOCOQUE*

par

M. Balş et Aurelia Roman

(Travail effectué à la II-e clinique des maladies transmissibles, Bucarest)

— Manuscrit reçu le 18 janvier 1960 —

À l'occasion d'autres recherches, nous avons constaté que le staphylocoque pathogène, dans certaines conditions, peut produire, outre des colonies typiques, des colonies d'une forme tout à fait particulière « explosées » ou en « étoile » (fig. A et B).

Ces étoiles, de nombre et formes variables, sont formées d'une colonie centrale de dimensions normales, présentant des prolongements radiaires, composés d'une enfilade de 2 à 10 colonies, sensiblement plus petites.

Ces rayons, au nombre de 1, 10, 20, mesurent de 2 à 6 mm et sont souvent plus effilés à leurs extrémités périphériques.

N'étant pas à même de fournir une explication valable du phénomène, nous ne ferons qu'en signaler les conditions d'apparition.

Une culture en bouillon, jeune (de 3 à 5 heures), de staphylocoque pathogène (hémolytique et coagulase positive) est diluée à raison de 1/100.000 en bouillon.

On mélange rapidement 1 ml de sang humain frais, prélevé au plus tard 30 à 60 secondes auparavant par ponction veineuse.

On étale, au moyen d'une baguette en verre, 0,1 ml du mélange, sur de l'agar (boîte Petri). La durée maximum d'exécution, à partir du prélèvement du sang jusqu'à l'ensemencement, ne devra pas dépasser 1 à 2 minutes.

Après 16 à 19 heures à 37°, on constate des colonies isolées, apparemment d'aspect classique, mais après quelques heures (19 à 22 après l'ensemencement), autour de quelques-unes de ces colonies apparaissent, les prolongements radiaires mentionnés, composés de colonies plus petites et plus jeunes.

Le phénomène ne se produit pas, si au lieu de sang frais, on utilise du sang défibriné, citraté, hépariné ou liquéfié; ou bien, si on utilise du plasma, du sérum humain normal, du fibrinogène en solution ou une solution chlorurée isotonique.

En conditions techniques identiques, le phénomène a été constamment observé dans toutes les sous-cultures, indifféremment de leur provenance, soit d'une colonie de staphylocoque d'aspect normal, soit du centre de la colonie en étoile, soit enfin, d'une des petites colonies qui constituent les rayons, même après dix passages successifs.

Les qualités bactériologiques et biochimiques de ces germes n'ont pas varié au cours de ces passages.

Les colonies en « étoile » ont pu être reproduites avec toutes les souches de staphylocoque pathogène essayées (25 souches récemment isolées) phénomène qui ne s'est pas produit avec des staphylocoques non-pathogènes ou autres bactéries.

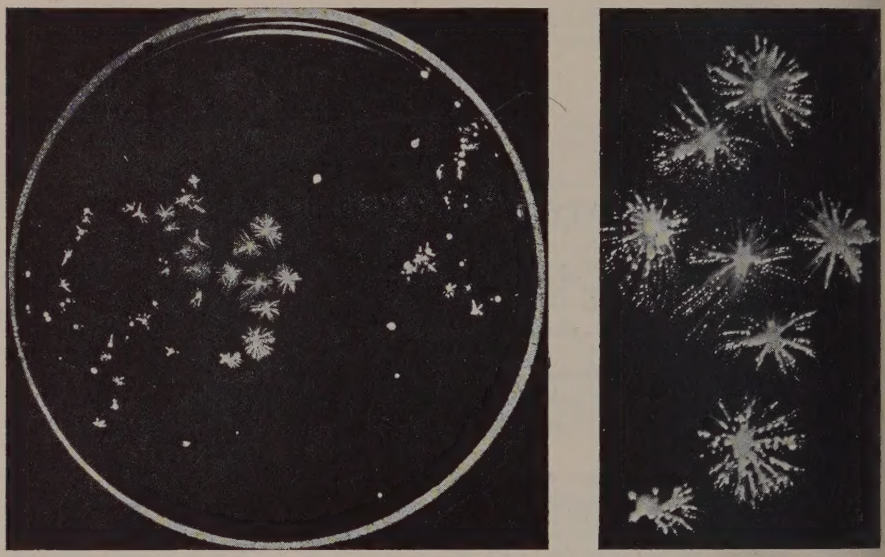


Fig. 1. — Original. (Détail de la fig. 1.) (3x).

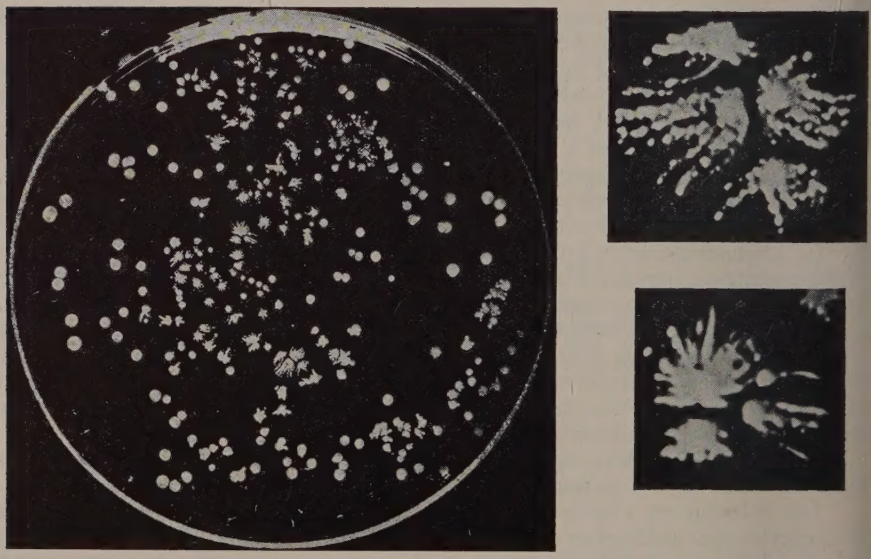


Fig. 2. — Original. (Détails de la fig. 2), (7x).

АТИПИЧНЫЕ КОЛЛОНИИ СТАФИЛОКОККА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Описаны атипичные « взорванные » (« в виде звезды ») колонии стафилококка, появившиеся при особых условиях работы.

Описывается применяемая методика, состоящая из заражения свежей крови малым количеством патогенных стафилококков с последующим посевом на агаре в чашках Петри и учетом после выдерживания в течении суток при 37°.

Данное явление отмечено у всех штаммов патогенного стафилококка, которыми мы пользовались, и не встречается у других микробов.

ATYPISCHE STAPHYLOKOKKENKOLONIEN

Es werden atypische, „explodierte" („sternförmige") Staphylokokkenkolonien beschrieben, die unter besonderen Arbeitsbedingungen auftreten. Die angewandte Arbeitsmethode wird beschrieben. Sie besteht in der spärlichen Infizierung von frischem Blut mit pathogenen Staphylokokken, gefolgt von der Verimpfung auf Agar in Petrischalen. Ablesung nach 24 Stunden. Bebrütung bei 37°C.

Bei allen untersuchten Stämmen von pathogenen Staphylokokken, jedoch bei keiner anderen Keimart, konnte diese Erscheinung beobachtet werden.

ATYPICAL STAPHYLOCOCCUS COLONIES

SUMMARY

Atypical „exploded" („star-shaped") staphylococcus colonies are described, which appear in particular working conditions. The method used is described. It consists in sparse seeding of fresh blood with pathogenic—staphylococci and subsequent inoculation on agar in a Petri dish. Reading is performed after 24 hours of incubation at 37°C.

All strains of pathogenic staphylococci tested were found to display this phenomenon, which was absent in the case of other germs.

Intreprinderea Poligrafică Nr. 4, Calea Şerban Vodă 133–135, Bucureşti.

945